

**Univerzita Karlova**

**Přírodovědecká fakulta**

Katedra buněčné biologie

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



**Téma práce: Koaxiální nanovlákná s inkorporovanými suplementy pro řízenou chondrogenní diferenciaci**

**Coaxial nanofibers with incorporated supplements for regulated chondrogenic differentiation.**

Diplomová práce

Bc. Gabriela Korbelová

Vedoucí práce: Mgr. Michala Rampichová, Ph.D.

Praha, 2019

„Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci na téma Koaxiální nanovlákná s inkorporovanými suplementy pro řízenou chondrogenní diferenciaci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.“

V Praze dne

---

Bc. Gabriela Korbelová

#### Poděkování:

Velice děkuji své školitelce Mgr. Michale Rampichové, Ph.D., která mi byla během práce oporou a dávala mi cenné rady. Rovněž bych chtěla poděkovat celé laboratoři Tkáňového inženýrství a v neposlední řadě i mé rodině, která mi byla rovněž oporou.

## ABSTRAKT

Na poli regenerativní medicíny začíná být stále diskutovanější téma regenerace defektů chrupavky vzniklých ať už příčinou úrazu, či věkem podmíněnou degenerací. Možnost zajištění vhodného prostředí pro buněčnou adhezi, proliferaci, diferenciaci a lokální působení bioaktivních látek nabízejí nanovláknenné nosiče, které svojí strukturou napodobují extracelulární matrix (ECM) hyalinní chrupavky. Tyto nosiče jsou implantovány do pacienta osazené autologními chondrocyty. Pro získání jejich dostatečného množství, musí být po izolaci z pacienta namnoženy *in vitro*. Chondrocyty však při kultivaci na 2D prostředí kultivačního plastu rychle dediferencují a ztrácí tak schopnost syntetizovat molekuly ECM. Cílem práce byla modulace chondrogenního diferenciačního média - nalezení ideální koncentrace chondrogenních suplementů L-askorbátu-2-fosfátu (A2P) a dexametazonu (DEX) při kultivaci primárních chondrocytů na nanovláknenném poly- $\epsilon$ -kaprolaktonovém (PCL) nosiči. Byl studován vliv různých koncentrací chondrogenních suplementů na adhezi chondrocytů na nosič, jejich proliferaci a diferenciaci po dobu 21 dnů. Byl studován vliv samotných suplementů v médiu, jejich synergický účinek s ostatními chondrogenními suplementy a nakonec byly A2P a DEX uzavřeny do samotných PCL vláken. Bylo prokázáno, že A2P má pozitivní vliv na metabolickou aktivitu chondrocytů. U DEX byla prokázána indukce exprese genů pro chondrogenní markery. Pokud byly suplementy přidány do média společně, jejich efekty se potencovaly. Pokud byly suplementy uzavřeny do vláken, nejlépe indukovala udržení chondrogenní diferenciací skupina 5PLM obsahující dvojnásobné koncentrace chondrogenních suplementů, než je obsaženo ve standardním diferenciačním médiu. Výhodou uzavření suplementů dovnitř vláknenného nosiče je možnost jejich postupného uvolňování v místě defektu.

**KLÍČOVÁ SLOVA:** chondrocyty, chondrogenní diferenciací, odstředivé zvlákňování, L-askorbát-2-fosfát, dexametazon



## ABSTRACT

In the field of regenerative medicine, regeneration of cartilage defects (caused either by injury or age-related degeneration) has become a widely discussed topic. Nanofibrous scaffolds provide a suitable environment for cell adhesion, proliferation, differentiation, and also for the local involvement of bioactive substances. Nanofibrous scaffolds mimic the extracellular matrix (ECM) of hyaline cartilage. These scaffolds are seeded with autologous chondrocytes. After having been isolated from the patient, the cells must be cultivated *in vitro* in order to obtain a sufficient amount of chondrocytes. Scaffolds with cultivated chondrocytes are later implanted back into the patient. Chondrocytes, however, when grown on a 2D tissue culture plastic rapidly de-differentiate and thus lose the ability to synthesize ECM molecules. The aim of the work was modulation of chondrogenic differentiation medium through finding the ideal concentration of chondrogenic supplements, composed of L-ascorbate-2-phosphate (A2P) and dexamethasone (DEX), in the culture of primary chondrocytes seeded on a nanofibrous polycaprolactone (PCL) scaffold. The effect of different concentrations of the chondrogenic supplements on chondrocyte adhesion to the scaffold and their proliferation and differentiation was studied. The influence of each of the supplements alone in the medium was studied, then their synergistic effect together with other chondrogenic supplements, and finally A2P and DEX were incorporated into the PCL fibers themselves. It has been demonstrated that A2P has a positive effect on chondrocyte metabolic activity. DEX has been proved to induce gene expression for chondrogenic markers. If the supplements were added into the medium at the same time, their effects became even more potent. The supplements were studied in 21-day experiments. If the supplements were incorporated in the fibers, the 5PLM group containing double concentrations of chondrogenic supplements than those present in the standard differentiation medium was best for maintaining chondrogenic differentiation. The advantage of incorporating the supplements inside the nanofiber scaffolds is the fact that it enables their gradual release at the defect site.

**KEY WORDS:** chondrocytes, chondrogenic differentiation, centrifugal spinning, L-ascorbate-2-phosphate, dexamethasone

# OBSAH

<b>SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>1</b>
<b>ÚVOD.....</b>	<b>5</b>
<b>1. TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>8</b>
1.1 CHRUPAVKA.....	8
1.1.1 ECM CHRUPAVKY.....	8
1.2 TYPY BUNĚK V CHRUPAVCE.....	10
1.2.1 KULTIVACE CHONDROCYTŮ, DEDIFERENCIACE A REDIFERENCIACE IN VITRO .....	12
1.2.2 CHONDROGENNÍ KOMPONENTY.....	15
1.2.2.1 L-ASKORBÁT-2-FOSFÁT .....	16
1.2.2.2 DEXAMETAZON.....	17
1.2.2.3 DALŠÍ CHONDROGENNÍ KOMPONENTY PŘIDÁVANÉ VOLNĚ DO MÉDIA.....	18
Transkripční faktory z TGF- $\beta$ rodiny .....	18
Insulin-transferin-selenium-X (ITS-X).....	18
1.3 VÝVOJ CHONDROCYTŮ Z MSC .....	19
1.3.1 MESENCHYMÁLNÍ KMENOVÉ BUŇKY.....	19
1.3.1.1 VÝSKYT MSC - NIKA .....	20
1.3.2 CHONDROGENEZE .....	22
1.3.3 SIGNALIZAČNÍ KASKÁDY V CHONDROGENEZI.....	22
1.3.3.1 WNT KASKÁDA .....	22
1.3.3.2 HEDGEHOG KASKÁDA .....	23
1.3.4 TRANSKRIPČNÍ FAKTORY V CHONDROGENEZI.....	24
1.3.4.1 RUNX2.....	25
1.3.4.2 SOX9.....	27
1.3.4.3 OSTERIX.....	29
1.3.5 RŮSTOVÉ FAKTORY V CHONDROGENEZI .....	30
1.3.5.1 TGF- $\beta$ RODINA.....	30
1.3.5.2 FGF .....	31
1.3.5.3 IGF-1 .....	32
1.4 TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ.....	32
1.4.1 SOUČASNÁ LÉČBA DEFEKTŮ CHRUPAVKY .....	33
1.4.1.1 MIKROFRAKTURY .....	34
1.4.1.2 OSTEOCHONDRÁLNÍ AUTOGRAFT.....	35
1.4.1.3 IMPLANTACE AUTOLOGNÍCH CHONDROCYTŮ.....	35
1.4.1.4 NOSIČEM INDUKOVANÁ IMPLANTACE AUTOLOGNÍCH CHONDROCYTŮ (MACI).....	36
1.4.2 TKÁŇOVÉ NOSIČE .....	37
1.4.2.1 BIOMATERIÁLY .....	37
1.4.2.2 HYDROGELY.....	38
1.4.3 NANOVLÁKNA.....	39
1.4.3.1 KOAXIÁLNÍ NANOVLÁKNA.....	40
1.4.3.2 KOMPOZITY.....	41
1.4.3.3 POLYMERY .....	41
POLY- $\epsilon$ -KAPROLAKTON (PCL) .....	42
1.4.3.4 METODY PŘÍPRAVY NANOVLÁKEN.....	43
1.4.3.5 ELEKTROSTATICKÉ ZVLÁKŇOVÁNÍ.....	43
1.4.3.6 ODSTŘEDIVÉ ZVLÁKŇOVÁNÍ .....	45
1.4.3.7 FUNKCIONALIZACE NANOVLÁKEN .....	46
<b>2. MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>48</b>
2.1 CHEMIKÁLIE.....	48
2.2 PŘÍSTROJE .....	49
2.3 PŘÍPRAVA NANOVLÁKENNÝCH PCL NOSIČŮ .....	49
2.4 IZOLACE CHONDROCYTŮ .....	50

2.5	KULTIVACE CHONDROCYTŮ .....	51
2.6	NASAZENÍ CHONDROCYTŮ V MÉDIU .....	51
2.7	MTS TEST .....	52
2.8	KVANTIFIKACE BUNĚČNÉ DNA .....	52
2.9	SKENOVACÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE.....	53
2.10	KONFOKÁLNÍ MIKROSKOPIE.....	53
2.10.1	Adheze buněk - DiOC6 a propidium jodid .....	53
2.10.2	detekce kolagenu II - Alexa fluor 488 a propidium jodid.....	53
2.11	IZOLACE RNA.....	54
2.12	KVANTIFIKACE RNA .....	55
2.13	RT-PCR ANALÝZA .....	55
2.14	STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ.....	56
<b>3.</b>	<b>VÝSLEDKY EXPERIMENTŮ.....</b>	<b>57</b>
3.1	CHARAKTERIZACE PCL NANOVLÁKEN .....	58
3.2	POZOROVÁNÍ KULTIVACE V RŮSTOVÉM A DIFERENCIAČNÍM MÉDIU .....	60
3.3	VLIV CHONDROGENNÍCH MOLEKUL VOLNĚ PŘIDANÝCH DO MÉDIA .....	62
3.3.1	<i>Experiment č. 1 - Vliv askorbátu-2-fosfátu bez přidáných chondrogenních suplementů na adhezi, proliferaci a diferenciaci chondrocytů .....</i>	<i>62</i>
3.3.1.1	MTS test.....	63
3.3.1.2	Kvantifikace buněčné DNA .....	65
3.3.1.3	Konfokální mikroskopie .....	66
3.3.1.4	Skenovací elektronová mikroskopie .....	68
3.3.1.5	Imunobarvení prokolagenu typu II .....	69
3.3.1.6	RT-PCR .....	71
3.3.2	<i>Experiment č. 2 – L-askorbát-2-fosfát v médiu s dalšími chondrogenními suplementy (DEX, ITS-X).....</i>	<i>72</i>
3.3.2.1	MTS test.....	72
3.3.2.2	Kvantifikace buněčné DNA .....	74
3.3.2.3	Konfokální mikroskopie .....	74
3.3.2.4	Imunobarvení prokolagenu typu II .....	76
3.3.2.5	RT-PCR .....	78
3.3.3	<i>Experiment č. 3 – Vliv dexametazonu v médiu bez dalších suplementů na adhezi, proliferaci a diferenciaci primárních chondrocytů .....</i>	<i>78</i>
3.3.3.1	MTS test.....	78
3.3.3.2	Kvantifikace buněčné DNA .....	79
3.3.3.3	Skenovací elektronová mikroskopie .....	80
3.3.3.4	Konfokální mikroskopie .....	82
3.3.3.5	Imunobarvení prokolagenu typu II .....	83
3.3.3.6	RT-PCR .....	85
3.3.4	<i>Experiment č. 4 – Vliv dexametazonu v médiu s dalšími chondrogenními suplementy (A2P, ITS-X) na adhezi, proliferaci a diferenciaci primárních chondrocytů .....</i>	<i>87</i>
3.3.4.1	MTS test.....	87
3.3.4.2	Kvantifikace buněčné DNA .....	88
3.3.4.3	Konfokální mikroskopie .....	89
3.3.4.4	Imunobarvení prokolagenu typu II .....	91
3.3.4.5	RT-PCR .....	92
3.4	VLIV MALÝCH CHONDROGENNÍCH MOLEKUL INKORPOROVANÝCH DO VLÁKEN .....	93
3.4.1	<i>Experiment č. 5 – Inkorporace askorbátu-2-fosfátu do PCL nanovláken s dalšími suplementy a sledování jeho vlivu na adhezi, proliferaci a diferenciaci chondrocytů.....</i>	<i>93</i>
3.4.1.1	MTS.....	93
3.4.1.2	Kvantifikace buněčné DNA .....	96
3.4.1.3	Konfokální mikroskopie .....	97
3.4.1.4	Imunobarvení prokolagenu typu II .....	99
3.4.1.5	RT-PCR .....	100
3.4.2	<i>Experiment č. 6 - Inkorporace dexametazonu do PCL nanovláken s dalšími suplementy a sledování jeho vlivu na adhezi, proliferaci a diferenciaci chondrocytů.....</i>	<i>101</i>

3.4.2.1	MTS.....	102
3.4.2.2	Kvantifikace buněčné DNA .....	103
3.4.2.3	Konfokální mikroskopie .....	104
3.4.2.4	Imunobarvení prokolagenu typu II .....	106
3.4.2.5	RT-PCR .....	108
<b>4.</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>109</b>
<b>5.</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>120</b>
<b>6.</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>121</b>

## SEZNAM ZKRATEK

<b>ACI</b>	implantace autologních chondrocytů
<b>APC</b>	anafázi podporující komplex
<b>A2P</b>	L-askorbát-2-fosfát
<b>Bak</b>	agonista smrti interagující s doménou BH3
<b>Bax</b>	Bcl2 asociovaný X protein
<b>Bcl-xS</b>	velmi krátký B-buněčný lymfom
<b>bFGF</b>	základní fibroblastový růstový faktor
<b>Bid</b>	Bcl-2 homologní antagonist
<b>BMP</b>	kostní morfogenetický protein
<b>BMPRI</b>	BMP receptor typu I
<b>BMPRII</b>	BMP receptor typu II
<b>BSA</b>	hovězí sérový albumin
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	vápenatý ion
<b>CD</b>	diferenciační skupina
<b>CFU-Fs</b>	kolonie formující fibroblasty
<b>cGMP</b>	cyklický guanosin monofosfát
<b>CKI</b>	kaseinová kináza-I
<b>Col10a1</b>	kolagen typu X - alfa 1 řetězec
<b>COMP</b>	oligomerní matrixový protein chrupavky
<b>DEX</b>	dexametazon
<b>Dhh</b>	desert Hedgehog
<b>DiOC6</b>	3,3'- dihexyloxakarbocyanin jodid
<b>Dlx5</b>	méně distální homeobox protein
<b>DMEM</b>	Dulbeccovo modifikované Eagle médium
<b>DMSO</b>	dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	deoxyribonukleová kyselina
<b>Dvl</b>	dishevelled
<b>ECM</b>	extracelulární matrix
<b>EDTA</b>	kyselina ethylendiamintetraoctová

<b>ER</b>	endoplazmatické reticulum
<b>ERK</b>	extracelulární signálně regulované kinázy
<b>FBS</b>	fetální bovinní sérum
<b>FDA</b>	úřad pro kontrolu potravin a léčiv
<b>FGF</b>	fibroblastový růstový faktor
<b>FGFR</b>	receptor fibroblastového růstového faktoru
<b>Fzd</b>	frizzled
<b>GAG</b>	glykosaminoglykan
<b>GDF</b>	růstový diferenciační faktor
<b>GSK3</b>	glykogen syntáza kináza 3
<b>HA</b>	kyselina hyaluronová
<b>HLA-DR</b>	lidské leukocytární antigeny – izotyp DR
<b>hMSC</b>	lidská mezenchymální kmenová buňka
<b>HMDS</b>	hexamethyldisilazan
<b>HSC</b>	hematopoetická kmenová buňka
<b>IGFBPs</b>	proteiny vázající růstový faktor podobný insulinu
<b>Ihh</b>	indian Hedgehog
<b>IL6</b>	interleukin-6
<b>IMDM</b>	Iscoveovo modifikované Dulbeccovo médium
<b>IP3</b>	inositoltrifosfát
<b>IGF-1</b>	inzulinu podobný růstový faktor 1
<b>ITS-X</b>	insulin-transferrin-selenium-X
<b>JNK</b>	c-Jun N-terminální kináza
<b>LIF</b>	leukocytární inhibiční faktor
<b>LRP5/6</b>	koreceptor LDL receptoru příbuzného proteinu 5 a 6
<b>MACI</b>	nosičem indukovaná implantace autologních chondrocytů
<b>MAPK</b>	mitogen-aktivovaná proteinová kináza
<b>MCSF</b>	makrofágový kolonii-stimulující faktor
<b>MMP13</b>	matrixová metaloproteáza 13

<b>MTS</b>	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
<b>MSC</b>	mezenchymální kmenové buňky
<b>NGF</b>	nervový růstový faktor
<b>NLS</b>	jaderný lokalizační signál
<b>NMTS</b>	signál zaměřený na nukleární matici
<b>OSE2</b>	osteoblast-specifický element 2
<b>Osx</b>	osterix
<b>PBS</b>	fosfátový pufr
<b>PCL</b>	poly-ε-kaprolakton
<b>PCP</b>	planární polarity buňky (nekanonická dráha)
<b>PDGF</b>	růstový faktor krevních destiček
<b>PGA</b>	polyglykolová kyselina
<b>PI3K</b>	fosfatidylinositol 3' kináza
<b>PLA</b>	polylaktidová kyselina
<b>PLC</b>	fosfolipáza C
<b>PLGA</b>	kopolymer kyseliny polymléčné a polyglykolové
<b>PLLA</b>	polymléčná kyselina
<b>PP</b>	polypropylen
<b>PTH</b>	parathyroidní hormon
<b>PTHrP</b>	protein související s parathyroidním hormonem
<b>PTH/PTHrP</b>	receptor parathyroidního hormonu/proteinu souvisejícího s parathyroidním hormonem
<b>PVA</b>	polyvinylalkohol
<b>P300</b>	protein p300
<b>Rho</b>	člen Ras homologní rodiny
<b>RNA</b>	ribonukleová kyselina
<b>ROCK</b>	proteinkináza asociovaná s Rho GTPázami
<b>RT-PCR</b>	polymerázová řetězová reakce v reálném čase
<b>RunX2</b>	runt příbuzný transkripční faktor 2
<b>SDF 1</b>	stromální derivovaný faktor 1

<b>SEM</b>	skenovací elektronová mikroskopie
<b>Shh</b>	sonic hedgehog
<b>Sox</b>	pohlaví determinující region
<b>TCF/LEF</b>	T buněčný faktor/lymfoid podporující faktor
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	transformující růstový faktor $\beta$
<b>Tgfr2</b>	TGF- $\beta$ receptor typu 2
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	tumor nekrotizující faktor $\alpha$
<b>UV</b>	ultrafialová
<b>VEGF</b>	vaskulární endoteliální růstový faktor
<b>Wnt</b>	Wingless/Int-1
<b>WWP2</b>	WW doménu obsahující E3 ubikvitin protein ligáza 2
<b><math>\alpha</math>SMA</b>	$\alpha$ aktin hladkého svalstva
<b>2D</b>	dvojměrné
<b>3D</b>	trojměrné



## ÚVOD

Regenerace defektů chrupavek je v současné době stále aktuálnějším tématem vzhledem ke zvyšování průměrného věku lidské populace a četnosti výskytu chrupavčitých defektů. V důsledku absence inervace a vaskularizace jsou možnosti regenerace hyalinní chrupavky limitovány. Je nutné nacházet nové biomateriály a metody použití, které zkrátí dobu hojení a napomůžou k obnově původní funkce regenerované tkáně. Oblast tkáňového inženýrství přináší možnost využití vlastních buněk pacienta v kombinaci s biokompatibilním nosičem, který by svou strukturou měl napodobovat extracelulární matrix (ECM) chrupavky a tím podporovat buněčnou adhezi a proliferaci.

Pro úspěšnou chondrální regeneraci je klíčové zajistit podporu 2 složek – buněk a nosiče, na kterém budou buňky růst. Při implantaci chondrocytů izolovaných z pacienta je hlavním problémem udržení buněčné morfologie při jejich expanzi *in vitro*. V buněčné kultuře totiž chondrocyty rychle dediferencují, pokud ztratí vhodné trojrozměrné (3D) prostředí. Pro udržení buněčné morfologie chondrocytů je důležitá ECM produkovaná chondrocyty, sestávající z husté 3D sítě proteinů, polysacharidů a především kolagenu typu II. Pro navození chondrogenní diferenciace *in vitro* se k chondrocytům také přidává kultivační médium s chondrogenními suplementy, jakými je např. insulin-transferin-selenium-X (ITS-X), L-askorbát-2-fosfát (A2P) a dexametazon (DEX). Používají se standardizovaná média s danými koncentracemi chondrogenních suplementů. Nanovláknenné nosiče připravené odstředivým zvlákněním svou 3D strukturou napodobují mikroprostředí ECM chrupavky. Tím napomáhají adhezi chondrocytů, což by mohlo urychlit proces hojení. Další výhodou nanovláken připravených procesem centrifugačního zvláknění je možnost enkapsulace těchto chondrogenních suplementů. Tyto bioaktivní látky se z nanovláknenného nosiče mohou definovaným způsobem podle potřeby uvolňovat v čase.

Cílem této práce bylo studium vlivu různých koncentrací chondrogenních suplementů L-A2P a DEX na adhezi, proliferaci a udržení chondrogenního fenotypu primárních prasečích chondrocytů. Ty byly kultivovány na poly-ε-kaprolaktonovém (PCL) nanovláknenném nosiči připraveném metodou centrifugačního zvláknění. Porovnávalo bylo použití různých koncentrací těchto 2 látek buď volně přidaných do média či zvlákněných přímo do jádra nanovláken.

Práce je členěna na část teoretickou a praktickou. V teoretické části se nacházejí kapitoly Chrupavka a Tkáňové inženýrství. Kapitola Chrupavka se věnuje popisu struktury a vlastnosti této tkáně v podkapitolách ECM chrupavky a Typy buněk v chrupavce. Podkapitola Kultivace chondrocytů, dediferenciace a rediferenciace *in vitro* představuje současně využívané postupy a podmínky *in vitro* pro vhodnou kultivaci chondrocytů. Podkapitola Chondrogenní komponenty podává přehled o složkách kultivačního média (především A2P a DEX) důležitých pro navození chondrogenní diferenciaci *in vitro*. V podkapitole Vývoj chondrocytů z mezenchymálních kmenových buněk (MSC) jsou rozebrány signalizační kaskády vedoucí k chondrogenní diferenciaci. V kapitole Tkáňové inženýrství se nachází podkapitola Současná léčba, kde se zaměřuji na současné možnosti medicíny v léčbě osteochondrálních defektů. V podkapitole Tkáňové nosiče jsou představeny typy biomateriálů nabízející alternativní možnost léčby. Tato podkapitola se dále zaměřuje na nanovlákná a metody jejich přípravy.

Část praktická se nejprve zaměřuje na Materiál a metody v práci použité a dále se řadí na 6 experimentů. V každém experimentu byl zkoumán vliv buď látky A2P či DEX na adhezi, proliferaci a diferenciaci chondrocytů na PCL nanovlákněném nosiči. V experimentech č. 1 a č. 2 byl zkoumán A2P. V experimentu č. 1 byl A2P přidáván k buňkám v kultivačním médiu bez dalších suplementů, v experimentu č. 2 byl přidáván do média i v kombinaci s dalšími chondrogenními suplementy média (DEX, ITS-X). V experimentech č. 3 a č. 4 byl zkoumán DEX. V experimentu č. 3 byl DEX do kultivačního média přidáván samostatně, v experimentu č. 4 v kombinaci s dalšími chondrogenními suplementy (A2P, ITS-X). V posledních experimentech č. 5 a č. 6 byly obě látky zvlákněny spolu s dalšími suplementy do jádra PCL nanovláken ve stejném množství jako v experimentech č. 2 (A2P) a č. 4 (DEX). Byl studován vliv jejich uvolňování na růst a diferenciaci chondrocytů.

Cíle práce:

1. Výběr vhodných koncentrací diferenciačních faktorů pro udržení chondrogenního fenotypu primárních prasečích chondrocytů
2. Inkorporace faktorů do vláken za účelem optimalizace jejich uvolňování
3. *In vitro* testování nosičů a udržení chondrogenního fenotypu primárních chondrocytů pomocí uvolňovaných faktorů a její pozorování

Hypotéza:

1. Přítomnost L-askorbátu-2-fosfátu a dexametazonu v médiu nebo v kombinaci s dalšími faktory bude podněcovat chondrogenní diferenciaci a udržení chondrogenního fenotypu primárních prasečích chondrocytů
2. Existuje optimální koncentrace L-askorbátu-2-fosfátu a dexametazonu, která buňky nejlépe stimuluje k udržení chondrogenní diferenciaci

# 1. TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 CHRUPAVKA

Chrupavka je specializovaná vláknitá pojivová tkáň, která se vyznačuje pevností a pružností. Postrádá vaskularizaci a inervaci a proto je schopnost její regenerace výrazně snížena. Na základě složení a uspořádání buněk - chondrocytů a mezibuněčné hmoty (ECM) se rozděluje se na tři základní typy a to chrupavku hyalinní (neboli kloubní), elastickou a vazivovou. Elastická chrupavka se nachází např. na ušních boltcích, či v Eustachově trubici. Buňky se v elastické chrupavce vyskytují ve skupinách po 2-3 a její ECM tvoří síť kolagenu typu II a elastinu. Vazivovou chrupavku můžeme nalézt např. na meziobratlových ploténkách. Ve vazivové chrupavce jsou buňky izolované a ECM tvoří kolagen typu I. Avšak zdaleka nejrozšířenější typ chrupavky v lidském těle je chrupavka hyalinní (Renate Lüllmann-Rauch 2012).

Hyalinní chrupavka má poloprůhledný vzhled a kryje kloubní plochy většiny kloubů. Jedná se o tkáň sestávající z chondrocytů, obklopených ECM, kterou tyto buňky vyprodukují. Chondrocyty se vyskytují izolovaně, v lakunách obklopených ECM a tvoří pouze 1% celkového objemu hyalinní chrupavky (Temenoff and Mikos 2000). Další informace o chrupavce se budou vztahovat k hyalinní chrupavce.

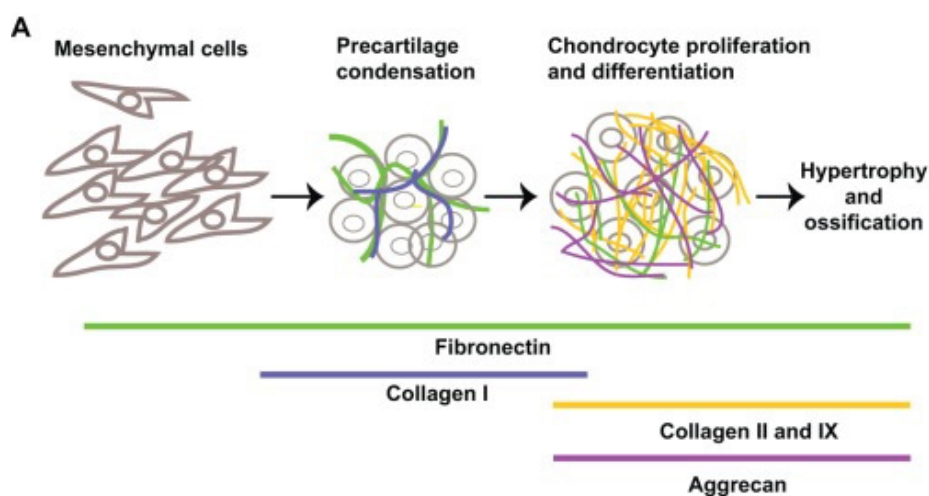
### 1.1.1 ECM CHRUPAVKY

Jedinečné vlastnosti hyalinní chrupavky, především její pevnost a pružnost, jsou způsobené její specifickou ECM a vysokou koncentrací vody (až 80% hmotnosti vody) (Buckwalter and Mankin 1998b). ECM chrupavky obsahuje kromě vody i kolageny, proteoglykany a proteiny nekolagenního typu.

Komplexní síť tvořená proteiny ECM, především kolageny, dává chrupavce jako celku tvar a její mechanické vlastnosti. Chrupavka, především kloubní, během života člověka prochází extrémní zátěží a opotřebením. Buňky je nutné v případě poškození rychle nahradit a ECM znovu přestavit do podoby, která zajistí minimální opotřebení chrupavčité tkáně. ECM kromě zajištění vhodných mechanických vlastností dává buňkám i zpětnou informaci, kterým směrem se má remodelace ubírat, zda do syntézy či degradace (Buckwalter and Mankin 1998b). To je možné díky spojení ECM s buňkami přes integrinové receptory.

Základ ECM kloubní chrupavky tvoří kolagenové sítě, v nichž až 90-95% zastupuje kolagen typu II, ostatní typy kolagenu jsou zastoupeny minoritně (Adolphe, Thenet-Gauci, and Demignot 1997). Kolagen typu II byl objeven v roce 1969 (Miller and Matukas 1969). Jedná se o fibrilární protein z kolagenové rodiny, do které patří dalších 28 členů. Společným strukturním motivem jsou 3 vzájemně se ovíjející  $\alpha$  helixy polypeptidových podjednotek, jejichž zastoupení se u jednotlivých členů liší, mohou být doplněny o další  $\alpha$  řetězce, molekulární izoformy a supramolekulární struktury (Ricard-Blum 2011). Tuhost a pevnost v tahu zajišťuje především síť z kolagenových tříd II, IX a XI. Připojení chondrocytů k této fibrilární síti zase zajišťují kolagenová vlákna typu VI (Buckwalter and Mankin 1998b).

Další složky ECM chrupavky jsou proteoglykany a glykosaminoglykany (GAG). Dominantní místo zde zaujímá proteoglykan agrekan. Molekuly agrekanu se spojí do supramolekulární struktury o 50 monomerech a interagují s filamenty hyaluronanu. Napomáhají zachování tuhosti a odolnosti chrupavky při zvyšování tlaku (Knudson and Knudson 2001). Dále tvoří ECM chrupavky proteiny, které vzájemně propojují jednotlivá vlákna mezi sebou a tím dále stabilizují celou ECM (např. dekorin, biglykan, fibromodulin). Nekolagenní protein anchorin CII ukotvuje chondrocyty do ECM. Buňky interagují s kolagenovou sítí přes buněčné receptory, což vede k regulaci jejich migrace, proliferace a diferenciaci (Ricard-Blum 2011). K dalším proteoglykanům patří syndekany a glypikany, malé na leucin bohaté proteoglykany jako dekorin, lumikan, perlekan apod. (Knudson and Knudson 2001). Do GAG patří keratan sulfát, chondroitin sulfát či dermatan sulfát, kyselina hyaluronová (HA), fibrogenin či laminin.



**Obr. č. 1 – Formovaná ECM v jednotlivých fázích chondrogenese.** Exprimované proteiny fibronektin, kolagen typu I, kolagen typu II, kolagen typu IX a agrekan. Převzato z (P. Singh and Schwarzbauer 2012).

Na obr. č. 1 můžeme vidět tvorbu jednotlivých proteinů ECM v různých fázích chondrogenese. Při proliferaci a diferenciaci chondrocyt je nejvíc syntetizovaný kolagen typu II a kolagen typu IX.

Proteiny nekolagenního typu v chrupavce většinou zajišťují další propojení v mezibuněčné hmotě, či mohou ovlivňovat ECM-chondrocytární interakce. Interakce mezi ECM a chondrocyty mohou ovlivňovat další zástupci nekolagenních proteinů, jako např. tenascin či fibronectin. ECM tedy hraje klíčovou úlohu v signalizaci pro chondrocyty a remodelaci tkáně. Chondrocyty totiž dokáží detekovat změny ve složení i organizaci ECM v případě, kdy dochází k degradaci chrupavky, dokáží odpovědět syntézou vhodných molekul, či syntézou buněk, aby regenerovaly vzniklou nerovnováhu (Buckwalter and Mankin 1998b).

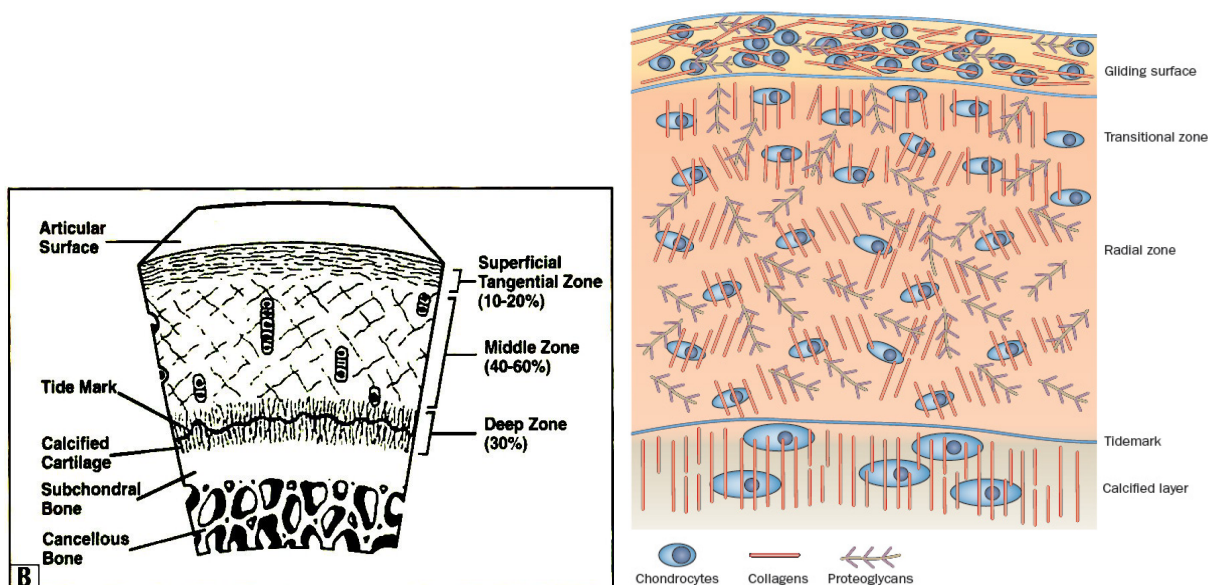
## **1.2 TYPY BUNĚK V CHRUPAVCE**

Chondrocyty jsou základní buňky chrupavky, které se vyvíjejí z MSC. Chondrocyty jsou buňky sférického či polygonálního tvaru vyskytující se izolovaně mezi komponenty ECM, kterou sami produkují. Nachází se v lakunách, což jsou malé dutiny, ve kterých se buňky vyskytují buď izolovaně, či v malých (tzv. izogenetických) skupinách. Pokud jsou zde izolované, nevytváří tedy spolu s dalšími chondrocyty mezibuněčný kontakt a signalizace probíhá hlavně přes ECM. Od jiných buněčných typů se chondrocyty liší produkcí a hromaděním proteoglykanů a kolagenu typu II (Buckwalter and Mankin 1998a).

Chondrocyty a chondrocytům-podobné buňky se od sebe mohou lišit i navzájem v genové expresi v závislosti na tom, z jakého typu chrupavky pochází. V hyalinní chrupavce může exprese antagonistů inhibujících signalizaci kostního morfogenetického proteinu (BMP) a wingless/int-1 (Wnt) signalizaci zaručovat udržení chondrogenní morfologie buněk a zabránit terminální diferenciaci chondrocytů. Naproti tomu existují např. chondrocyty osteofytické, tvořící kalcifikované výběžky podél kloubů. Ty budou mít větší nestabilitu fenotypu a větší tendenci tvořit hypertrofické chondrocyty (Gelse et al. 2012).

Struktura chrupavky se dá rozdělit do jednotlivých vrstev lišících se svým složením a uspořádáním. Chondrocyty se v jednotlivých vrstvách liší svým tvarem a syntézou složek ECM. Viditelná je vrstva povrchová, pod níž se nachází zóna přechodná, střední a v hlubší

vrstvě kalcifikovaná chrupavka. Na ní navazuje subchondrální kost a spongiosní kost (Minas and Nehrer 1997).



Obr. č. 2 – Řez kloubní chrupavkou – A: vrstvy chrupavky – povrchová, přechodná, střední, kalcifikovaná (Minas and Nehrer 1997), B: rozložení chondrocyt a ECM napříč vrstvami (Hardin, Cobelli, and Santambrogio 2015).

Na obr. č. 2 můžeme vidět jednotlivé vrstvy chrupavky s rozložením buněk a ECM. Povrchová vrstva je ze všech vrstev v chrupavce nejtenčí, avšak odolávající tlaku, pevná v tahu a. Charakteristická je svým nízkým obsahem proteoglykanů a naopak hustě rovnoměrně rozloženými kolagenovými vlákny zarovnanými rovnoběžně. Tvar chondrocytů je zde diskovitý. Obsahuje také velké množství fibronektinu a vody. Pod povrchovou vrstvou se nachází objemnější zóna přechodná. Mění se tvar chondrocytů, které mají sférický tvar. V ECM přechodné zóny jsou zastoupeny více proteoglykany a méně kolagenovými vlákny, která jsou větší, než v zóně povrchové, obsahují méně vody (Temenoff and Mikos 2000; Poole 1997).

Ve střední vrstvě zaujímající nejvíce prostoru, se nacházejí chondrocyty zaobleného či sférického tvaru uspořádané ve sloupcích kolmo na zónu povrchovou. ECM střední vrstvy obsahuje největší množství proteoglykanů a nižší množství kolagenových vláken, která jsou největší napříč vrstvami. Obsah vody je ve střední vrstvě nejnižší. Vůči povrchu jsou vlákna uspořádána příčně či zcela náhodně.

Kalcifikovaná zóna navazuje na střední vrstvu a postupuje v subchondrální kost, mezi střední vrstvou a subchondrální kostí se vyskytuje bazofilní linie, která ohraničuje počátek kalcifikované zóny. V kalcifikované zóně se postupně zvyšuje tvrdost tkáně, jedná se o

přechod mezi chrupavkou a kostí. Chondrocyty jsou zde hypertrofované, mají malou metabolickou aktivitu, jsou menší, obklopeny někdy zcela ECM, která je kalcifikována (Temenoff and Mikos 2000; Hardin, Cobelli, and Santambrogio 2015).

### **1.2.1 KULTIVACE CHONDROCYTŮ, DEDIFERENCIACE A REDIFERENCIACE *IN VITRO***

Aby bylo možné využít chondrocyty v oblasti regenerativní medicíny, je nutné je nejprve v laboratoři kultivovat pomocí již vytvořených standardizovaných protokolů. Chrupavka obsahuje pouze 1 % chondrocytů, je potřeba je izolovat a vhodně kultivovat, aby dělením dostatečně zvýšily svůj počet (Temenoff and Mikos 2000). Vhodnou kultivaci lze zajistit výběrem typu kultivačního povrchu, média a počtu provedených pasáží během kultivace.

Chondrocyty se přirozeně vyskytují v trojrozměrném (3D) prostředí v chrupavce, kde jsou obklopeny proteiny ECM, zajišťujícími udržení fenotypu chondrocytu (Mauck, Yuan, and Tuan 2006). Při *in vitro* pokusech se nejprve izolují z původní tkáně jejím rozvolněním z ECM pomocí enzymů (jako kolagenáza typu II) a dále se kultivují *in vitro* v inkubátoru.

Kultivovat chondrocyty lze na různých typech povrchů. Jedním z nich jsou např. kultivační láhve z polystyrenu, které jsou optimalizovány pro buněčnou adhezi a růst. V kultivačních lahvích se chondrocyty dále dělí, avšak vytváří posléze monovrstvu na jejím dně. V těchto podmínkách se chondrocyty nachází ve dvourozměrném (2D) prostředí, mají zde často tendenci dediferencovat do fibroblastového fenotypu (Holtzer et al. 1960).

Chondrocyty však v tomto fenotypu nemusí setrvávat a mohou rediferencovat zpět do své původní kulovité morfologie, což je zapříčiněno opět navrácením do 3D prostředí napodobujícího ECM chrupavky. Proto se využívají i jiné typy povrchů. Chondrocyty se kultivují jako pelety ve falkonách (Imabayashi et al. 2003), na alginátových kapkách (Bonaventure et al. 1994; G. et al. 2002), či na agaróze (Holtzer et al. 1960; Schuh et al. 2012). Tyto materiály více napodobují původní 3D prostředí chrupavky, než kultivační plast. Jeho povrch však může být i obohacen o látky jako agrekan či kolagen II. Při statické kultivaci na povrchu s kolagenem II nedocházelo k rediferenciaci a expresi genů pro chondrogenní markery. U vrstvy z agrekanu však docházelo k podobné expresi, jako při kultivaci v 3D prostředí agarózy (Darling and Athanasiou 2005a).



Výhodou kultivace v monovrstvě je rychlé namnožení buněk, nevýhodou zvýšená možnost dediferenciace. Stockdale et al. pozoroval na agaru lepší podmínky pro chondrogenezi, konkrétně syntézu glykosaminoglykanu chondroitin-sulfátu typického pro postmitotické chondrocyty. U monovrstvy oproti tomu panovaly lepší podmínky pro proliferaci, neboť se zde zvýšila syntéza deoxyribonukleové kyseliny (DNA), syntéza glykosaminoglykanu se ale snížila (Stockdale et al. 1963).

Při studiu genové exprese při kultivaci chondrocytů pomocí polymerázové řetězové reakce v reálném čase (RT-PCR) bylo zjištěno, že růst chondrocytů a pasáž, ve které se nacházejí, ovlivňuje expresi genů pro proteiny ECM (Darling and Athanasiou 2005a). Při izolaci buňky vykazují kulovitý fenotyp s expresí chondrogenních markerů, typicky kolagen typu II a proteoglykany jako agrekan. U fibroblastové morfologie se objevuje exprese kolagenu typu I a vimentinu (Schnabel et al. 2002). Expresí především kolagenu typu I, II a agrekanu se lišila mezi pasážemi. Zatímco exprese genu pro kolagen typu II se s přibývajícím pasážemi snižovala, po kultivaci a ztrátě 3D prostředí exprese genu pro kolagen typu I a vimentin naopak rostla (Darling and Athanasiou 2005a). Kang et al. např. naměřili u chondrocytů v monovrstvě vysokou expresi genu pro kolagen typu II s nižší expresí genu pro kolagen typu I v 2. pasáži. V 5. pasáži se situace obrátila (Kang, Yoo, and Kim 2007). Se zvyšující se pasáží byla rovněž pozorována snížená viabilita chondrocytů, přibývalo apoptotických buněk (Kang, Yoo, and Kim 2007), což se vysvětluje ztrátou kontaktu chondrocytů s kolagenem typu II a dalšími komponenty ECM v průběhu dediferenciace (Hirsch et al. 1997; K. G. A. Yang et al. 2006).

Pokud byly chondrocyty nasazené z monovrstvy do 3D prostředí alginátových kapek, bylo zjištěno, že z prvních 4 pasáží (každá po 3 dnech) chondrocyty opět znovunabyly svůj fenotyp spolu s expresí genů pro chondrogenní markery kolagen II a typické proteoglykany. Naproti tomu chondrocyty z pasáže 5-8 chondrogenní markery neexprimovaly, po 4. pasáži již buňky nerediferenciovaly, zachovávaly si fibroblastový fenotyp (G. et al. 2002). V této pasáži již chondrocyty nevratně dediferencují a k rediferenciaci v 3D prostředí nedochází (G. et al. 2002). Při experimentu je tedy vhodné zvážit možnosti, jak zajistit pokud možno nejmenší množství pasáží pro zajištění dostatečného množství buněk. K rapidním změnám v genové expresi a fenotypu chondrocytů může však docházet již po první pasáži (Darling and Athanasiou 2005b).

Navozovat 3D prostředí tedy mohou nejrůznější typy povrchů vhodných pro kultivaci chondrocytů, což testovaly studie rediferenciace. Při kultivaci králíčních chondrocytů na

alginátových kapkách, představující 3D prostředí, se již po 4 dnech objevila znovu i exprese markerů kolagenu typu II a agrekanu (Lemare, Steimberg, and Griel 1998). To se podařilo i u chondrocytů z lidské kloubní chrupavky kultivovaných na alginátových kapkách. Docházelo k rediferenciaci fenotypu a k syntéze kolagenu typu II a jeho prekurzorů (pro alpha 1II, pc alpha 1II, a pn alpha 1II) (Bonaventure et al. 1994). K rediferenciaci docházelo i na alginátovém hydrogelu (Zeng et al. 2015).

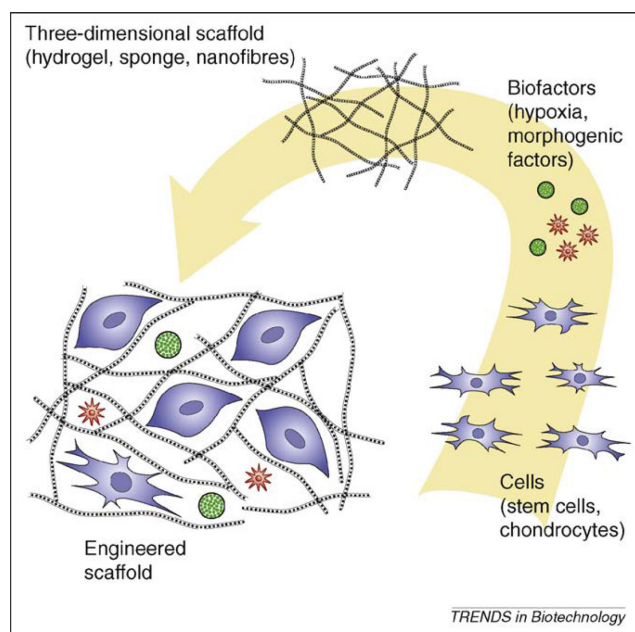
Nanovláknenné nosiče se ukázaly být rovněž vhodným 3D prostředím vzhledem k podobnosti s kolagenními sítěmi ECM chrupavky. Lidské kloubní chondrocyty kultivované na nanovláknenném nosiči z polylaktidové kyseliny (PLA) po 28 dní na nosiči proliferovaly a znovu rediferenciovaly. Tomu nejspíše napomohlo vysoce porézní 3D prostředí (>90%, velikost póru 100  $\mu\text{m}$ ) PLA nosiče vytvořené metodou elektrostatického zvlákňování (Hanna Stenhamre et al. 2013). Velikost pórů se ukázala být důležitým faktorem pro rediferenciaci a tvorbu nové chrupavky. Při kultivaci artikulárních chondrocytů na nosiči z polyuretan-urey o velikostech pórů < 150  $\mu\text{m}$ , 150-300  $\mu\text{m}$  a 300-500  $\mu\text{m}$  se ukázal nejmenší průměr pórů nejlepším pro tvorbu nové hyalinní chrupavky a syntézu proteinů pro ni typických (H. Stenhamre et al. 2011).

Rovněž kultivace na dalších typech polymerních nanovláknenných nosičů jako kopolymer kyseliny mléčné a glykolové a kolagenu podporovala rediferenciaci dediferencovaných chondrocytů. Po druhé pasáži v monovrstvě, kdy došlo k dediferenciaci a syntéze kolagenu typu I, se po nasazení na 3D nanovláknenný nosič podpořila syntéza kolagenu typu II a agrekanu, která byla v monovrstvě snížena (Guoping Chen et al. 2003).

Polymer PCL použitý v této práci rovněž podporuje rediferenciaci chondrocytů navozením 3D prostředí a je vhodný pro kultivaci chondrocytů (Recha-Sancho et al. 2016; Garcia-Giralt et al. 2008a; Jeong and Hollister 2010).

Při formaci chrupavčité tkáně *in vitro* může kromě 3D prostředí napomoci rediferenciaci dediferencovaných chondrocytů z druhé pasáže i kokultivace s primárními nepasážovanými chondrocyty, které nepodlehly dediferenciaci (Gan and Kandel 2007).

Po zajištění 3D prostředí, které je kritickým faktorem pro rediferenciaci, je dalším klíčovým bodem dodání vhodných chondrogenních faktorů. Ty indukují rediferenciaci po přidání do média v novém *in vitro* 3D prostředí nosiče, což vidíme na obr. č. 3 (viz Kapitola 1.2.2 Chondrogenní komponenty).



**Obr. č. 3 – Renegerace chrupavky kombinací 3 faktorů** – buněk (chondrocyt či MSC), nosiče a morfogenů (růstových a diferenciačních faktorů) podněcujících rediferenciaci do chrupavky (Claire Vinatier et al. 2009).

### 1.2.2 CHONDROGENNÍ KOMPONENTY

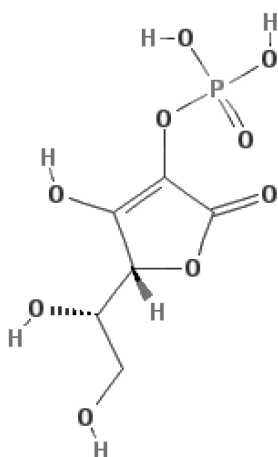
Kultivační médium navozující chondrogenezi (např. Dulbeccovo modifikované Eagle médium - DMEM, Iscoveovo modifikované Dulbeccovo médium - IMDM) musí obsahovat přidané chondrogenní komponenty. Jedním z typů přidávaných chondrogenních komponentů jsou růstové faktory. Jedná se především o růstové faktory z rodiny transformujících růstových faktorů  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) a to TGF- $\beta$ 2 a TGF- $\beta$ 3 a dále kostní morfologický protein-2 (BMP2), BMP4, BMP6 a BMP7 působící synergicky spolu s TGF- $\beta$ 2 a TGF- $\beta$ 3 (Solchaga et al. 2011, Gregory et al. 2005). Mimo rodinu TGF- $\beta$  se zmiňují i základní fibroblastový růstový faktor (bFGF) či insulinu podobný růstový faktor-1 (IGF-I). Transkripční faktory však mají řadu nevýhod a rizik. Kromě vysoké ceny mohou v organismu způsobovat nádorové bujení.

Pro snížení rizik se do média pro navození chondrogenese přidávají i jiné chondrogenní suplementy jako A2P, DEX, ITS. A2P a DEX jsou dále studovány v této práci z hlediska navození chondrogenese primárních chondrocytů na nanovlákněm povrchu.

Pro navození chondrogenní diferenciaci MSC izolovaných z kostní dřeně dospělé ovce bylo např. použito médium H-DMEM obsahující TGF- $\beta$ 3, IGF-I, DEX a vitamín C. (Y. Zhang et al. 2004).

### 1.2.2.1 L-ASKORBÁT-2-FOSFÁT

A2P je derivát vitamínu C neboli kyseliny askorbové. Ta se účastní procesu syntézy kolagenu, konkrétně hraje roli při hydroxylaci prolinu a lysinu na kolagenových řetězcích. Do média se tedy přidává za účelem zvýšení produkce kolagenu. Jako taková se ale kyselina askorbová v médiu rychle rozkládá a je nutno zajistit její dlouhodobější působení. Proto se v médiu používá její derivát A2P, který je stabilní po delší dobu a umožňuje déle trvající experimenty (Vater, Kasten, and Stiehler 2011). A2P ovlivňuje aktivitu 2 hydroláz – lysin hydroxylázy a prolin hydroxylázy. Ty hydroxylují prolinové a lysinové zbytky na kolagenu typu II a vytváří hydroxyprolin a hydroxylysin. Hydroxyprolin stabilizuje molekulu kolagenu, její triple-helix strukturu (Murad et al. 1981; Layman, Sokoloff, and Miller 1972). Nedostatek vitamínu C je spojen s tvorbou defektní pojivové tkáně (Peterkofsky 1991a), jenž je zapříčiněna degradací kolagenu (Tiku et al. 2003).



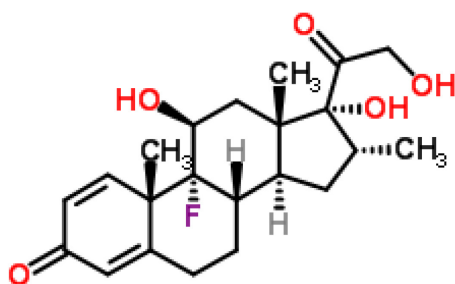
**Obr. č. 4 - Chemický vzorec askorbátu-2-fosfátu (Zdroj: Pubchem)**

Strukturu askorbátu-2-fosfátu můžeme vidět na obr. č. 4. Ve studiích chondrogenese bývá použito různé množství askorbátu – 25 µg/ml (Friedman, Long, and Hankenson 2006), 37,5 µg/ml (Diekman et al. 2010), 50 µg/ml (Ronzière et al. 2010; Matsuda et al. 2005; Shen et al. 2010), 170 µg/ml (Vogel et al. 2006) a 200 µg/ml (Diekman et al. 2010). Ve všech těchto studiích bývá kyselina askorbová kombinována se 100nM DEX, 100 ng/ml TGF-β a dalšími suplementy, např. IGF, hovězí sérový albumin (BSA), ITS, BMP 2/4/6 či kyselina linoleová.

### 1.2.2.2 DEXAMETAZON

DEX je syntetický glukokortikoid (viz obr. č. 5), který je používán pro studium chondrogenese *in vitro* pro svoji schopnost stimulovat diferenciaci MSC do adipogenní, chondrogenní, či osteogenní linie.

Je používán pro diferenciaci MSC do adipogenní, chondrogenní, či osteogenní linie. Obecně má vliv na transkripci. DEX ovlivňuje např. Runx2 závislou transkripci indukci transkripce integrinu  $\alpha 5$  (Runx2 je runt příbuzný transkripční faktor 2) (Vater, Kasten, and Stiehler 2011). V chondrogenezi je DEX důležitý pro transkripci kolagenu II jako hlavního proteinu ECM chrupavky. DEX v chondrocytech zvyšuje specificky expresi pohlaví determinujícího genu 9 (Sox9), transkripčního faktoru, který aktivuje prokolagen typu II, na expresi jiných faktorů (např. Sox6) neměl vliv (Sekiya et al. 2001).



Obr. č. 5 Chemický vzorec dexametazonu (Zdroj – Chempider)

Glukokortikoidy typu DEX se mohou využívat k léčbě rakoviny či zánětů. Bylo zjištěno, že glukokortikoidy aktivují kaskádu kaspáz a mitochondriální apoptózu zprostředkovanou Bcl2 asociovaným X proteinem (Bax). To se projevilo u myši i u lidských pacientů s glukokortikální léčbou úbytkem kostní a chrupavčité hmoty. Přítomnost DEX zvyšuje proapoptotické proteiny jako velmi krátký B-buněčný lymfom (Bcl-xS), Bad a agonistu smrti interagující s doménou BH3 (Bak) a způsobovala proteolýzu Bcl-2 homologního antagonisty (Bid). Proti apoptóze v proliferujících chondrocytech vyvolané DEX chránila chondrocyty částečně malá interferující ribonukleová kyselina (RNA) anti-Bid (Zaman et al. 2014). Při studiu prekurzorové buněčné linie chondrocytů - ATDC5, bylo zjištěno, že DEX má vliv na Wnt/ $\beta$ -kateninovou signální dráhu, která je zodpovědná za

diferenciaci do chondrocytů. DEX ji zde inhiboval a tím inhiboval i chondrogenní diferenciaci u buněčné linie ATDC5 (Naito, Ohashi, and Takahashi 2015a).

Byl studován vliv DEX a dalších komponentů média na osteogenní diferenciaci, zejména depozice kolagenu typu I a exprese osteogenních genů. MSC pocházející z lidské tukové tkáně a kostní dřeně byly kultivovány na PCL nanovláknenných nosičích. Bylo zjištěno, že DEX zde ovlivňoval nejen syntézu kolagenu typu I, ale i jeho organizaci. U MSC kultivovaných bez DEX se kolagen I nevyskytoval (Szöke et al. 2017).

Ve standardizovaných protokolech bývá většinou použito množství 100nM, kromě toho byl však použit i v množství 10 nM při osteogenní diferenciaci (Hildebrandt, Büth, and Thielecke 2009).

### 1.2.2.3 DALŠÍ CHONDROGENNÍ KOMPONENTY PŘIDÁVANÉ VOLNĚ DO MÉDIA

#### *Transkripční faktory z TGF- $\beta$ rodiny*

Pro navození chondrogenní diferenciace mohou být do média přidávány i růstové faktory. Nejběžněji se používají růstové faktory z rodiny TGF $\beta$ . Za nejúčinnější faktory pro navození chondrogenese se považují TGF $\beta$ -3 a (BMP)-6. DEX společně s TGF $\beta$ -3 velmi podporoval chondrogenní potenciál diferenciace lidských MSC (hMSC) ve 3D kultuře a některé studie dokázaly, že se tento potenciál s přidáním BMP-6 ještě navýšil (Puetzer, Petite, and Lobo 2010).

#### *Insulin-transferin-selenium-X (ITS-X)*

Z dalších chondrogenních suplementů je pro indukci chondrogenese používán i ITS (X. Liu et al. 2014). ITS napomáhá růstu chondrocytů a jejich diferenciaci do chondrogenní linie - např. v kombinaci s 2% fetálním bovinním sérem (FBS) u lidských chondrocytů nosního septa) (Chua et al. 2005) a rediferenciaci v expandovaných chondrocytech (např. v kombinaci s alginátovými kapkami) (Mandl et al. 2002; van Osch, van der Veen, and Verwoerd-Verhoef 2001).

U prasečích chondrocytů z ušní chrupavky podporoval ITS-X v médiu (1%) jejich proliferaci *in vitro* a zachování chondrocytární morfologie a v kombinaci s FBS podporoval tvorbu nové chrupavky (X. Liu et al. 2014). FBS jakožto sérum má však některé negativní aspekty. Aby se zamezilo škodlivým účinkům vyvolávaných sérem, byl dále ITS zkoumán jako substituent za FBS v médiu v bioreaktoru. Primární chondrocyty bez séra však

vykazovaly sníženou proliferaci, proto ho nemohl zcela nahradit, ale FBS a ITS působí ideálně synergicky (Y.-H. Yang and Barabino 2011).

## 1.3 VÝVOJ CHONDROCYTŮ Z MSC

### 1.3.1 MESENCHYMÁLNÍ KMENOVÉ BUŇKY

Pro pochopení struktury chrupavčité tkáně a jejích defektů se musíme nejdříve vrátit o krok zpět k buňkám, ze kterých může vzniknout primární a posléze i terminálně diferencovaný (neboli hypertrofovaný) chondrocyt. Jedná se o MSC, ze kterých vznikají chondrocyty procesem chondrogenese.

MSC jsou kmenové buňky schopné samoobnovy a především diferenciaci do specializovaných buněk požadované tkáně po stimulaci vhodnými faktory. MSC jsou buňky multipotentní, schopné diferencovat do buněčné linie zárodečného listu svého původu, tedy mesodermu. V těle se MSC nachází v prostředí zvaném nika, které udržuje jejich kmenovost a z kterého mohou buňky tzv. mechanismem homingu migrovat do poškozených tkání (Kolf, Cho, and Tuan 2007). MSC mohou diferencovat do adipogenní, osteogenní či chondrogenní linie (Pittenger et al. 1999).

Po dlouhou dobu byly MSC izolovány různými typy metod a ne zcela jednotně charakterizovány. Friedenstein et. al je poprvé objevili v roce 1966 (Friedenstein, Piatetzky-Shapiro, and Petrakova 1966). Jejich morfologie *in vitro* připomíná morfologii fibroblastovou, avšak není zcela jasně definována. Až díky Mezinárodní společnosti pro buněčnou terapii (International Society for Cellular Therapy - ISCT) byla vytvořena 3 minimální kritéria pro určení MSC. Buňka musí ochotně adherovat na plast při kultivaci za standartních podmínek. Musí exprimovat povrchové antigeny – označované jako diferenciacní skupina (CD), a to konkrétně CD105, CD73 a CD90 a zároveň u ní nesmí docházet k expresi povrchových antigenů CD34, CD45, CD14 či CD11b, CD79a či CD19 a lidské leukocytární antigeny – izotyp DR (HLA-DR). Nakonec musí být MSC v *in vitro* podmínkách schopny diferencovat do adipocytů, chondroblastů a osteoblastů (Dominici et al. 2006).

MSC mohou být izolovány z řady tkání, nacházejí se především v kostní dřeni, kde ve fibroblastové formě byly též nazvány jako kolonie formující fibroblasty (CFU-Fs). Komunikují spolu s hematopoetickými kmenovými buňkami (HSC). Samy představují nehematopoetickou buněčnou populaci v HSC nice kostní dřeni. Tyto interakce mezi hemato-

a nehameto- subpopulacemi buněk v HSC nice jsou již déle studovány, avšak teprve nyní bylo díky novým metodám možno definovat a odlišit od sebe populace buněk MSC a HSC v kostní dřeni na základě jejich imunofenotypu i v jejich kmenovém stádiu (Méndez-Ferrer, Scadden, and Sánchez-Aguilera 2015). MSC se dají získávat embryonálně, nejčastěji z pupečnickové krve v placentě, v dospělém jedinci je možný a hojně využívaný odběr z kostní dřene a dále z tukové tkáně či periferní krve (Gholamrezaeezhad 2011). Obecně se izolují z tkání mesodermálního původu, kromě tkáně kostní a tukové třeba i ze svalů a šlach (Kolf, Cho, and Tuan 2007).

V laboratoři vytvořené buněčné kolonie s multipotentním potenciálem připomínajícím svou morfologií, a vlastnostmi růstu MSC izolované z kostní dřene, bylo možno izolovat i z tkání ne nutně z mesodermu - jako mozek, játra, ledviny, slezina, plíce, kostní dřeň, svalů, thymu a pankreatu myši (Kolf, Cho, and Tuan 2007; da Silva Meirelles, Chagastelles, and Nardi 2006; Tropel et al. 2004). Po izolaci se buňky kultivují v laboratoři podle standardizovaných protokolů. Obecně nabízí MSC jedinečný terapeutický potenciál v léčbě defektů chrupavky.

#### 1.3.1.1 VÝSKYT MSC - NIKA

V mezodermálních tkáních se MSC nenachází izolovaně, ale v mikroprostředí, které se nazývá nika, poprvé byla popsána již v roce 1978. (Schofield 1978).

Snahy definovat prostředí niky začaly u izolace MSC z nejrůznějších tkání s identifikací jejich povrchových markerů a vedly k závěru, že vykazují určité podobnosti v jejich expresi. Nika obecně vykazuje perivaskulární charakter. U MSC z různých tkání se exprimoval  $\alpha$  aktin hladkého svalstva ( $\alpha$ SMA), a byly zde přítomné pozitivní markery Stro-1 a CD146. V kostní dřeni a zubní dřeni MSC s expresí výše zmíněných markerů lemovaly krevní cévy. Lokalizace perivaskulárních nik rozmístěných po těle v blízkosti krevního řečiště umožňuje snadnou migraci MSC do cévy a posléze do poškozené tkáně (Kolf, Cho, and Tuan 2007).

V nice se nachází nejen samotné kmenové buňky, ale i buňky stromální. Ty interagují s kmenovými buňkami i spolu navzájem. Dále je zde ECM propojené s buňkami přes transmembránové proteiny integriny a zajišťující mechanickou oporu niky (Jones and Wagers 2008; Gattazzo, Urciuolo, and Bonaldo 2014). Jedná se tedy o společný komplex MSC, extracelulárních proteinů, dalších solubilních faktorů a buněk, které dohromady udržují kmenovost MSC (Kolf, Cho, and Tuan 2007). K uvolnění MSC z niky do místa defektu tomu



jsou zapotřebí signální molekuly, které v prostředí níky spustí signální kaskádu vedoucí k uvolnění kmenových buněk. Signální molekuly, jako interleukin-6 (IL6), tumor nekrotizující faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), stromální derivovaný faktor 1 (SDF 1) a makrofágový kolonii-stimulující faktor (MCSF) se uvolňují přímo z místa defektu v rámci zánětlivé reakce a aktivují mesenchymální progenitorové buňky (Mehta et al. 2012). V této chvíli se začíná proces terminální diferenciaci a migrace kmenové buňky přes krevní cévy do místa defektu.

Sebeobnova kmenových buněk v nice je zajišťována především signalizací přes růstové faktory a cytokiny, mezi něž patří leukocytární inhibiční faktor (LIF), rodina FGF či ligandy účastníci se Wnt signalizace. LIF, jakožto cytokin působící na zachování kmenovosti MSC, má schopnost udržovat kmenovost i dalších typů kmenových buněk. Mechanismus jeho působení zatím není zcela znám, navrhuje se však parakrinní signalizace s okolními buňkami. FGF2 napomáhá udržení kmenovosti prodloužením životaschopnosti buněk v kultuře. Cílové geny FGF účastníci se tohoto procesu zatím nebyly objeveny, má pravděpodobně samoregulační funkci založenou na autokrinní signalizaci. Bylo zjištěno, že Wnt ligandy mohou také přispívat k udržení kmenovosti MSC v nice, a to konkrétně podporou proliferace a inhibicí osteogenní diferenciaci pomocí ligandu Wnt3a. Obecně však mají Wnt ligandy dosti pleiotropní účinky, účastní se i sebeobnovy kmenových buněk hematopoetického, nervového, střevního či kožního původu (Kolf, Cho, and Tuan 2007).

Udržování kmenovosti buněk v nice a přísná regulace signalizace jsou faktory důležité pro dlouhodobé udržení zásobárny kmenových buněk využitelných k regeneraci širokého spektra defektů v těle. Pokud dojde k chybám v signalizaci, v nice se mohou hromadit genetické mutace, které mohou vést až k tumorigenezi (Legate, Wickstrom, and Fassler 2009).

Schopnosti migrace MSC do místa defektu se říká mechanismus homingu (Kolf, Cho, and Tuan 2007). MSC mohou z kostní dřevě migrovat i do jiných tkání, např. svalů či plic. Začíná být zřejmé, že kapacita jejich migrace souvisí s expresí markeru Stro-1. Buňky neexprimující tento marker směřovaly spíše do samoobnovy a hojení HSC, kdežto Stro-1 pozitivní buňky napomáhaly hojení většiny tkání. Pokud jsou exogenní MSC vloženy *in vivo*, samotný charakter zranění moduluje jejich migraci a diferenciaci (Kolf, Cho, and Tuan 2007). Zdá se, že poškozené buňky v defektu vysílají diferenciací signály a signály indukující homing. Diferenciaci MSC do buněk poškozené tkáně byla také indukována přímým kontaktem MSC a diferencované tkáně, není to však podmínkou. Např. kokultivace MSC s osteoblasty spouštěla osteogenezi, přímý kontakt MSC s chondrocyty spouštěl rovněž

osteogenezi, nikoliv chondroogenezi. Pro diferenciaci MSC je kritickým faktorem prostředí, ve kterém se nachází (Kolf, Cho, and Tuan 2007).

### 1.3.2 CHONDROGENEZE

Chondrogenní diferenciace *in vitro* napodobuje procesy odehrávající se *in vivo* v chrupavce. Diferencované chondrocyty exprimují markery typické pro chrupavku, jako jsou transkripční faktory - sox-9, skleraxis a dále geny ECM - kolagen typu II, kolagen typu IX, agrekan, biglykan, dekorin, a oligomerní matrixový protein chrupavky (COMP), známý též jako thrombospondin-5. Diferenciaci MSC do buněk chrupavky indukují především růstové faktory z rodiny TGF- $\beta$ . Kromě nich se v signalizační dráze vedoucí do chondrogenní diferenciace uplatňují i další růstové faktory jako BMP, růstový diferenciační faktor (GDF) a ligandy Wnt.

### 1.3.3 SIGNALIZAČNÍ KASKÁDY V CHONDROGENEZI

#### 1.3.3.1 WNT KASKÁDA

Signalizace vedoucí do chondrogenní diferenciace z původního mesenchymálního progenitoru se účastní např. Wnt glykoproteiny. Wnt (Wingless/Int-1) signalizace je významná při regulaci celé řady vývojových procesů jakým je např. vývoj kostry, účastní se však i při rozvoji rakoviny. Je konzervovaná napříč druhy (Behrens 2000). Signalizace probíhá buď přes dráhu kanonickou (Wnt/ $\beta$ -katenin) či nekanonickou, a to buď nekanonickou dráhu planární polarity buňky (PCP), či nekanonickou vápníkovou dráhu (Wnt/vápník). Wnt rodina glykoproteinů ovlivňuje mezibuněčné interakce díky své parakrinní signalizaci (Hooper 1994; Niehrs 2012).

U dráhy kanonické se Wnt ligand se váže na receptor Frizzled (Fzd) spojený s G-proteinem a koreptorem LDL receptoru příbuzného proteinu 5 a 6 (LRP5/6) (Chun et al. 2008). Tím jsou aktivovány kaseinové kinázy, které fosforylují cytoplasmatické proteiny Dishevelled (Dvl) (Bhanot et al. 1996). V cytoplasmě se dále nachází komplex CKI/APC/GSK-3 $\beta$ , neboli komplex kaseinové kinázy-I (CKI), anafázi podporujícího komplexu (APC) a glykogen syntázy kinázy-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ). Tento komplex fosforyluje  $\beta$ -katenin, který je ubiquitinován a degradován v proteasomu.  $\beta$ -katenin je při inhibici Wnt signalizace udržován v nízké hladině. Pokud se však Wnt ligand naváže na receptor a signalizace se spustí, fosforylovaný protein Dishevelled inhibuje komplex APC/CKI/GSK-3 $\beta$ . Nefosforylovaný  $\beta$ -katenin je stabilizován a dále se translokuje do jádra, kde působí jako ko-

aktivátor T buněčného faktoru/lymfoid podporující faktoru (TCF/LEF). To vede k transkripci mnoha cílových genů, regulující řadu dějů, jako buněčný růst a migraci, a dále proliferaci či diferenciaci (Niehrs 2012; Chun et al. 2008).

Při kosterním vývoji se ze společných mesenchymálních progenitorů mohou vyvíjet buď osteoblasty, nebo chondrocyty. Pokud se spustí Wnt signalizace a stabilizuje se  $\beta$ -katenin, nasedá na osteoblastové prekurzory, dochází k diferenciaci MSC do osteoblastů a naopak k potlačení diferenciaci MSC do chondrocytů (Day et al. 2005). Pokud není Wnt signalizace spuštěna a  $\beta$ -katenin nenasedá na osteoblastové prekurzory, dochází naopak k diferenciaci do chondrocytů a osteoblasty se nevytváří (Hill et al. 2005).

Kanonická dráha za dalšího působení  $\beta$ -kateninu podporuje hypertrofii chondrocytů. Pokud dojde k inaktivaci  $\beta$ -kateninu, zvyšuje se exprese Sox9, což vede v procesu endochondrální (i intramembránové) osifikace k indukci diferenciaci do chondrocytů, nikoliv osteoblastů a mimo jiné také k zahájení chondrocytární hypertrofie a jejímu urychlení v pozdní fázi diferenciaci (Minina et al. 2002; Naski et al. 1998). Rapidně potlačená chondrocytární genová exprese a tím i chondrogenese nastala působením Wnt3a (Reinhold et al. 2006).

Nekanonická Wnt dráha také hraje roli v regulaci chondrogenese, je však na rozdíl od kanonické dráhy nezávislá na  $\beta$ -kateninu. Nekanonická PCP dráha se účastní kontroly polarity buňky aktivací člen Ras homolog family (Rho) GTPáz, které přeorganizují mikrotubuly cytoskeletu buňky. Nekanonická vápníková dráha napomáhá buněčným pohybům v časně fázi vývoje (Chun et al. 2008). To se děje po aktivaci fosfolipázy C (PLC) pomocí Fzd. Ta dále vytváří inositoltrifosfát ( $IP_3$ ), který vypustí vápenaté ( $Ca^{2+}$ ) ionty z endoplazmatického retikula (ER). Tím se zvýší koncentrace  $Ca^{2+}$  iontů uvnitř buňky se současným snížením koncentrace cyklického guanosin monofosfátu (cGMP) (De 2011).

### 1.3.3.2 HEDGEHOG KASKÁDA

U savců se vyskytují 3 proteiny z rodiny hedgehog, desert hedgehog (Dhh), sonic hedgehog (Shh) a indian hedgehog (Ihh) hrající roli v procesu diferenciaci buněk v embryu i v dospělci (Kumar, Balczarek, and Lai 1996).

Na regulaci dějů v endochondrální osifikaci se podílí Ihh. K jeho sekreci a expresi dochází v prehypertrofických chondrocytech, či v rané fázi hypertrofie. Ihh řídí expresi

proteinu souvisejícího s parathyroidním hormonem (PTHrP) (St-Jacques, Hammerschmidt, and McMahon 1999).

PTHrP ligand se vylučuje v různých tkáních a působí parakrinně. Navazuje se na receptor parathyroidního hormonu/proteinu souvisejícího s parathyroidním hormonem (PTH/PTHrP receptor). Kromě PTHrP se tedy na receptor může navázat i parathyroidní hormon (PTH), který má jinou funkci, souvisí s regulací hladiny vápníku (Lanske et al. 1996). Bylo zjištěno, že pro tyto ligandy existují i jiné receptory, na které se navazují (Lanske et al. 1996).

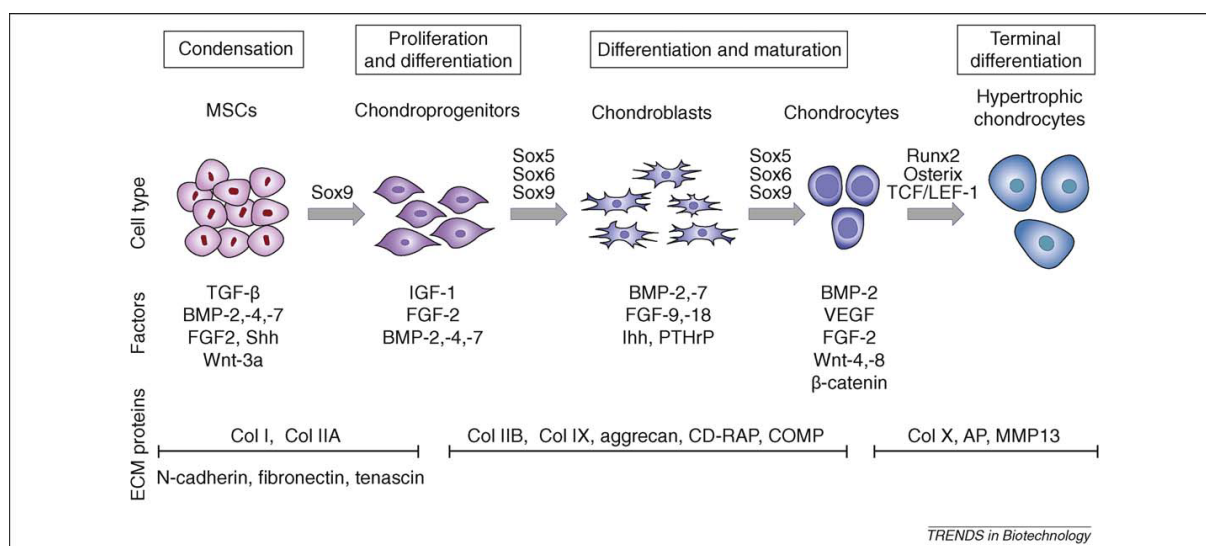
Signalizace pomocí Ihh a PTHrP podporuje proliferaci chondrocytů a zabraňuje hypertrofii chondrocytů (St-Jacques, Hammerschmidt, and McMahon 1999). Společně regulují diferenciaci chondrocytů pomocí negativní zpětné vazby (Vortkamp et al. 1996). V prehypertrofických chondrocytech se aktivuje Ihh signalizace a zvýší se exprese PTHrP. Tím se podpoří proliferace chondrocytů a zabrání se jejich finální diferenciaci do hypertrofie. Vyšší exprese PTHrP tedy prodlužuje čas diferenciaci chondrocytů, jeho funkcí je regulace času hypertrofické diferenciace. Pokud dojde k finální diferenciaci, chondrocyty již neexprimují Ihh. Při delecí Ihh dochází ke snížení proliferace chondrocytů a předčasnému nástupu hypertrofie. Pokud chceme hypertrofii inhibovat, lze opět zvýšit expresi Ihh. Inhibici hypertrofie zvýšením Ihh lze zrušit delecí PTHrP, kdy může být Ihh signalizace na PTHrP závislá (Lanske et al. 1996).

Existuje však i možnost PTHrP-nezávislé dráhy se stejnou funkcí jako PTHrP závislá, která využívá transkripční faktory rodiny glioblastomových genových produktů 1, 2 a 3 (Gli1,2,3) (Karp et al. 2000; Pan, Wang, and Wang 2009). Ihh se může navazovat i na transmembránový protein Patched, čímž dojde k aktivaci inhibovaného transmembránového proteinu Smoothed a dále je aktivován komplex Gli 2/3, který směřuje do jádra. Zde aktivuje expresi Gli1 se současnou inhibicí represoru Gli3. Gli2 dále spouští expresi genů pro proteiny Osterix a RunX2, spouštějící diferenciaci do osteoblastů. Tyto markery však hrají roli i v chondrogenезi. Z buňky se hedgehog protein dostává pomocí transmembránového proteinu Dispatched (James 2013).

### **1.3.4 TRANSKRIPČNÍ FAKTORY V CHONDROGENEZI**

Většina komunikace mezi chondrocyty neprobíhá přes buněčný kontakt, ale pomocí rozpustných solubilních faktorů, jako jsou růstové faktory, cytokiny a další molekuly. Chondrogenese má několik fází. V prvotní fázi chondrogenese se uplatňuje transkripční

faktor Sox9 spolu s dalšími proteiny z rodiny SOX, který napomáhá k indukci diferenciaci MSC do chondrocytů. V poslední fázi diferenciaci do hypertrofických chondrocytů budou na geny související s hypertrofií působit transkripční faktory runt příbuzný transkripční faktor 2 (RunX2) a Osterix, což můžeme vidět na obrázku č. 6 (Vinatier et al. 2009).



**Obrázek č. 6 - Jednotlivé fáze chondrogenese.** V každé fázi chondrogenese je přítomno jiné rozložení růstových a diferenciacních faktorů v průběhu času. V obrázku znázorněno pod každým buněčným typem. Proteiny ECM náležící ke každé fázi chondrogenese jsou v obrázku na nejnižší úrovni. Abbreviations: AP, alkaline phosphatase; CD-RAP, cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein; Col, collagen; COMP, cartilage oligomeric protein; MMP, matrix metalloprotease; VEGF, vascular endothelial growth factor. Převzato z (Vinatier, et al., 2009)

#### 1.3.4.1 RUNX2

RunX2 (označován rovněž Cbfa1, Aml3 či Pebp2αA) je transkripční faktor, který je členem rodiny RunX proteinů. Regulace pomocí těchto proteinů funguje na úrovni aktivace či represe genů v jádře, účastnících se různorodých procesů. Každý RunX protein má jinou funkci. RunX3 je např. důležitý pro růst střevního epitelu a RunX1 pro hematopoézu v dospělosti (tzv. definitivní hematopoézu) (Toshihisa Komori 2002; Jonason et al. 2009). RunX2 se účastní procesu chondrogenese, konkrétně její poslední části při tvorbě hypertrofických chondrocytů. Kromě toho se účastní diferenciaci MSC do osteoblastů při tvorbě kosti, především v jejím počátku, vyskytuje se však i v průběhu proliferace osteoblastů (Marie 2008). V pozdní fázi osteogeneze naopak pozastavuje terminální diferenciaci osteoblastů (Marie 2008).

RunX2 lze aktivovat pomocí více než jedné signalizační kaskády, konkrétně může být přítomna TGF- $\beta$ , BMP, Src či Wnt signalizace (James 2013; T Komori and Kishimoto 1998). Při transkripční regulaci pomocí TGF- $\beta$  záleží na buněčném typu, tato signalizace tedy může pozitivně i negativně regulovat transkripci RunX2 (Lee et al. 2000).

Při vývoji osteoblastů se RunX2 váže na RunX konsenzus sekvenci (5'-PyGPyGGTPy-3'), neboli osteoblast-specifický element 2 (OSE2). Jedná se o sekvenci genů, které souvisí s fenotypem osteoblastů. Zde spolu s transkripčním koaktivátorem jádro-vázajícím faktorem  $\beta$  vytváří heterodimer (Marie 2008).

Do jádra se RunX2 dostává pomocí jaderného lokalizačního signálu (NLS), který se nachází vedle jeho DNA vázající domény a v jádru je dále směřován pomocí signálu zaměřeného na nukleární matici (NMTS) do míst asociovaných s nukleární matrix. Může být dále posttranslačně modifikován, má 10 lysinových zbytků, které mohou sloužit jako místa pro ubikvitinaci a acetylaci (Javed et al. 2008). Má rovněž serinové zbytky, které mohou být fosforylovány pomocí kináz či mnoha signálních drah a mít různé efekty při diferenciaci osteoblastů. RunX2 může být aktivován fosforylací např. pomocí mitogen-aktivovaných proteinových kináz (MAPK)/extracelulárních signálních regulátorů kinázy (ERK) a tím se později vázat na OSE2 (Jonason et al. 2009). Fibroblastový růstový faktor-2 (FGF-2) zvyšuje fosforylací ERK1/2 a tím fosforylací RunX2, který spouští expresi genů pro osteoblastogenezi a tím i formaci kosti (Jonason et al. 2009).

RunX2 může komunikovat s BMP-regulovanými Smads proteiny, kdy musí nejprve dojít k fosforylaci RunX2. Díky této protein-proteinové interakci mohou Smads proteiny rekrutovat RunX2 a zvýšit jeho transkripční aktivitu. Z rodiny Smad proteinů sRunX2 interagují např. proteiny Smad1, Smad3 a Smad5 (Marie 2008).

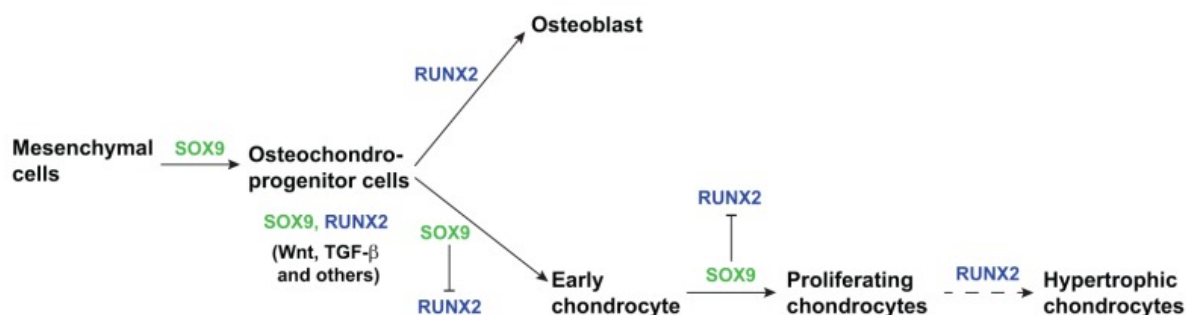
RunX2 hraje významnou roli v maturaci a proliferaci chondrocytů. Interakcí se Smad proteiny může navozovat hypertrofii u zralých chondrocytů společně s transkripčním faktorem RunX2, který se také účastní navození hypertrofie. Komplex s RunX2 se navazuje do oblasti Ihh (indian hedgehog) promotoru, což má za následek silné zvýšení exprese daného genu (Yoshida et al. 2004). Pokud byly vyřazeny oba geny pro RunX2 i RunX3, byla pozorována úplná absence maturace chondrocytů (Yoshida et al. 2004). Pokud byla spuštěna exprese RunX2 v nezralých chondrocytech, byly exprimované hypertrofické markery jako kolagen typu X – alfa 1 řetězec (Col10a1), matrixovou metaloproteázu 13 (MMP13) a vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF). Hypertrofie chondrocytů byla pak navozena i v místech, kde se běžně nevyskytuje (Takeda et al. 2001).

RunX2 je esenciální faktor v chondrogenezi, a proto musí být zajištěna jeho správná exprese a regulace. Pokud došlo k vyřazení (neboli genovému knockoutu) RunX2 u myší, bylo pozorováno výrazné zpoždění nástupu hypertrofie u chondrocytů. Podobně byl mírně zpožděný nástup hypertrofie pozorován i u knockoutu u RunX3 se současnou cévní invazí do oblasti chrupavky (Yoshida et al. 2004).

#### 1.3.4.2 SOX9

Stejně jako RunX2 se maturace chondrocytů účastní i Sox9, což je transkripční faktor aktivující geny, které se účastní chondrogeneze pro tvorbu plně fungující chrupavčité tkáně (Weimin Bi et al. 1999). Sox9 náleží do rodiny SRY-související s HMG boxem (SOX). Obsahuje box s vysokou pohyblivostí (HMG box), což je DNA-vázající se doména proteinu obsahující 3 alfa helixy, které po navázání na DNA mění konformaci chromatinu (Stros, Launholt, and Grasser 2007; Thomas 2001; Ohba et al. 2015).

Marker Sox9 se při chondrogenezi objevuje již v počátku při kondenzaci MSC, jeho exprese je poté udržována během chondrogeneze a je umlčena v pozdní fázi diferenciaci (Lefebvre and Dvir-Ginzberg 2017; Akiyama et al. 2002). Na obr. č. 7 vidíme, že v této fázi se zvyšuje exprese markeru RunX2 (Purva Singh and Schwarzbauer 2012).

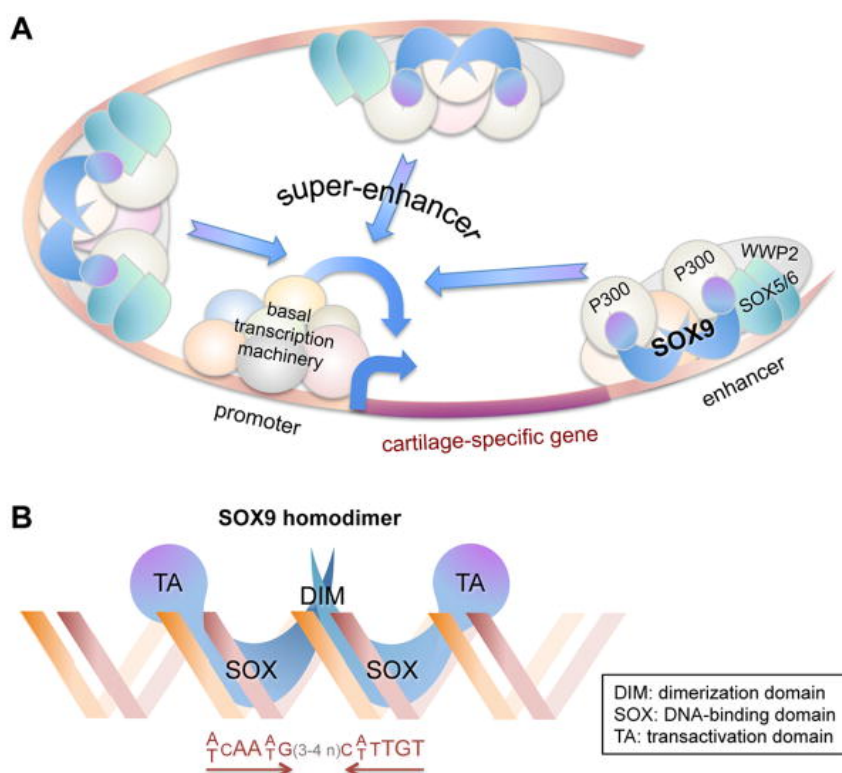


**Obr. č. 7 – Transkripční regulace MSC diferenciaci pomocí RunX2 a SOX9.** Převzato z (Purva Singh and Schwarzbauer 2012).

Bylo zjištěno, že Sox9 působí přímo na geny kódující komponenty ECM chrupavky (kolagen typu II, IX, and XI, agrekan a link protein) a rovněž na regulátory těchto komponentů (chondroitin 4-sulfotransferáza, CHST11). Přímé působení bylo rovněž pozorováno na proteiny účastnící se transkripce těchto komponentů, jako SOX5, SOX6 či doménu WW obsahující protein 2 (WWP2) či na proteiny hrající roli v signálních

kaskádách při chondrogenezi jako např. receptor fibroblastového růstového faktoru-3 (FGFR3) (Lefebvre and Dvir-Ginzberg 2017).

Molekulární mechanismus působení SOX9 může být rozdělen na 2 třídy. Třída I SOX9 proteinů se váže pomocí protein-proteinových interakcí přímo na promotor vysoce eprimovaného genu, blízko místa startu transkripce. Tyto geny však nemají význam pro chondrogenezi. Molekulární mechanismus třídy II je založen na spolupráci evolučně konzervovaných enhancerů, jejichž základem je SOX9 vázající se na DNA, na který se dále připojují jeho kofaktory jako SOX5/SOX6, protein p300 (P300) či WWP2. SOX5 a SOX6 jsou proteiny, které se rovněž vážou na DNA a kooperují se SOX9. SOX9 se v této třídě nachází mimo promotor v enhanceru upstream, či downstream od genu. Enhacery společně vytvoří tzv. „superenhancer“, kdy se spojí a společně působí na bazální transkripční komplex (viz obr. č. 8). Synergický efekt způsobuje vysokou míru exprese genu pro protein účastnící se chondrogeneze (Ohba et al. 2015).



**Obr. č. 8 – Schéma molekulární interakce SOX s DNA v chondrocytech.** A – Tzv. „superenhancer“ sestávající ze 3 enhancerů upstream i downstream od genu. Každý enhancer obsahuje Sox9 a jeho kofaktory (SOX5/SOX6, P300, WWP2). Vysoká exprese genu vytvářející specifické proteiny v chrupavce je způsobena synergickým efektem enhancerů. B – navázání SOX9 na DNA. Dvě molekuly SOX9 homodimerizují, v menším žlábků DNA jsou 2 SOX rozpoznávací místa oddělená 3 nebo 4 nukleotidy. Převzato z (Lefebvre and Dvir-Ginzberg 2017).



Sox9 je esenciálním faktorem pro chondrogenezi – při jeho absenci nemůže dojít k diferenciaci prechondrotických mesenchymálních buněk v chondrocyty (Weimin Bi et al. 1999) a jeho haploinsuficience (*Sox9*<sup>+/-</sup>) u myši vede k předčasné mineralizaci kostí, k hypoplázii chrupavčitých počátků (cartilage primordia) a následné smrti brzy po narození (Bi et al. 2001). U lidí je mutace Sox9<sup>+/-</sup> příčinou kampomelické dysplázie, vzácného autozomálně dominantního genetického a letálního onemocnění, projevující se abnormalitami skeletu, kraniofaciální dysmorfii a reverzí pohlaví, kdy pacienti nesoucí znaky ženského pohlaví mají karyotyp 46 XY (Wagner et al. 1994).

Exprese Sox9 je regulována několika způsoby – fosforylací na Ser181 (cAMP dependentní proteinkinázou A a proteinkinázou asociovanou s Rho GTPázami (ROCK) dojde k akumulaci Sox9 v jádře, což zvýší pravděpodobnost vazby Sox9 na DNA vedoucí k aktivaci či inhibici transkripce daných genů (Lefebvre and Dvir-Ginzberg 2017).

Regulace jeho aktivity a exprese musí být přísně regulována pro dlouhodobé zajištění správného chondrocytárního vývoje. Sox9 aktivuje transkripci mj. dalších proteinů ze Sox rodiny, a to Sox5 a Sox6 (Akiyama et al. 2002), které potom kooperují se Sox9 v regulaci chondrogeneze (C.-F. Liu and Lefebvre 2015).

Kromě iniciace diferenciaci MSC hraje Sox9 úlohu i v potlačování hypertrofie chondrocytů (W. Huang et al. 2001; W. Bi et al. 2001). Sox9 totiž brání expresi jiného transkripčního faktoru RunX2, který je transkripčním aktivátorem genů přítomných v hypertrofovaných chondrocytech (Zhou et al. 2006). Sox9 pak také přímo umlčuje transkripci některých genů, které jsou cílem RunX2, např. *Col10a1* (Leung et al. 2011).

Nakonec zvýšená exprese Sox9 vede také k fosforylaci  $\beta$ -kateninu, čímž je inhibována kanonická Wnt signální kaskáda, která znemožňuje diferenciaci chondrocytů a podporuje jejich hypertrofii (Topol et al. 2009).

Při inhibici Sox9 by tedy mělo docházet k diferenciaci buněk do hypertrofie, což bylo prokázáno při jeho inhibici v nedozrálých chondrocytech (W Bi et al. 2001).

#### 1.3.4.3 OSTERIX

Osterix (*Osx*) je transkripční faktor hrající roli při oddělení osteoblastové a chondrogení linie z původního osteochondroprogenitoru (Ryoo, Lee, and Kim 2006).

O jeho regulaci se zatím mnoho neví. Je pozitivně ovlivňován RunX2 (Lian et al. 2006; Nakashima and de Crombrughe 2003), sám však negativně ovlivňuje Sox9, díky

čemuž *Osx* působí jako negativní regulátor chondrogenese. Bylo také zjištěno, že transkripce *Osx* může být reprimována pomocí p53, čímž je zabráněno osteoblastogenezi (Marie 2008).

### 1.3.5 RŮSTOVÉ FAKTORY V CHONDROGENEZI

#### 1.3.5.1 TGF- $\beta$ RODINA

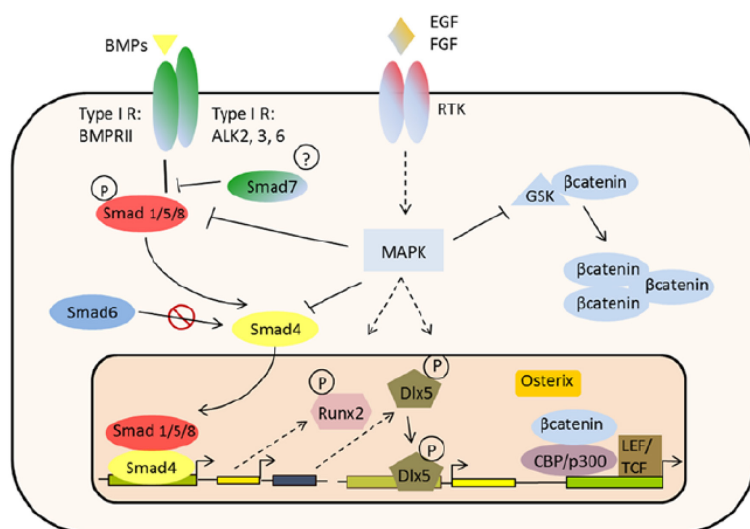
Na chondrogenezi se podílí i celá řada růstových faktorů. Patrně nejvýznamnější jsou růstové faktory z TGF superrodiny (transformující růstové faktory), konkrétně proteiny ze skupiny TGF $\beta$  – ty fungují jako cytokiny regulující např. buněčnou proliferaci. Tyto cytokiny jsou produkovány chondrocyty, fibroblasty, trombocyty, monocyty či osteoblasty. Patri mezi ně TGF- $\beta$ , který se může v chrupavce vyskytovat ve více různých izoformách (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 a TGF- $\beta$ 3) nebo strukturně podobné proteiny BMP, aktiviny či anti-Müllerian hormon. TGF- $\beta$ , BMP a další členové TGF- $\beta$  skupiny slouží jako ligandy pro TGF- $\beta$  receptory, které se nacházejí na povrchu buněk a jsou trojího typu (I, II, III). Často dochází k navázání na dimer TGF- $\beta$  II Ser/Thr receptor kinázy, ta katalyzuje TGF- $\beta$  I Ser/Thr receptor kinázu, která je také dimer. Spolu s ligandem tvoří aktivační komplex (Horbelt, Denkis, and Knaus 2012; Schmierer and Hill 2007).

Aktivace TGF- $\beta$  I receptoru umožňuje přenos signálu dále do buňky pomocí fosforylace SMAD proteinů. Signální kaskáda nakonec vyústí v hromadění SMAD-obsahujících proteinových komplexů v jádře, kde regulují expresi vedoucí k buněčnému dělení či jeho zastavení.

Studie potvrzují, že TGF- $\beta$  signalizace spouští chondrogenezi (Carrington et al. 1991; Leonard et al. 1991; Chimal-Monroy and Díaz de León 1997; Merino et al. 1998; Karamboulas, Dranse, and Underhill 2010). Pokud však ovlivněním exprese TGF- $\beta$  receptoru typu 2 (*Tgfr2*) byla zablokována v mezenchymu nově se formující končetiny, nemělo to vliv na prvotní fázi chondrogenese. Byl pozorován pouze efekt na jejich diferenciaci, případně formaci kloubů (Seo and Serra 2007; Spagnoli et al. 2007).

BMP-indukované signální kaskády (viz obr. č. 9) využívají ligandy BMP a jejich BMP receptory typu I (BMPRI) a BMP receptory typu II (BMPRII), buď koordinačně na preformovaný komplex BMPRI/II, či na BMPRI, který později aktivuje BMPRII. Aktivace těchto receptorů vede k fosforylaci transkripčních faktorů SMAD, konkrétně SMAD1, SMAD5 a SMAD8, které jsou asociovány s ko-SMAD-4. Dohromady vytvoří komplex

proteinů, který je směřován do jádra. Zde aktivuje geny RunX2, méně distální homeobox protein (Dlx5) a Osterix (Carreira et al. 2014; Guigian Chen, Deng, and Li 2012). SMAD 6 a 7 mohou působit proti tvorbě proteinového komplexu SMAD1/5/8 a ko-SMAD-4. SMAD 1 může být rovněž fosforylován pomocí Erk, P38, c-Jun N-terminální kinázy (JNK), MAPkinázami a GSK-3, což zajistí směřování SMAD-1 do cytoplasmy a jeho proteozomální degradaci (Sapkota et al. 2007).



**Obr. č. 9 – Signalizace BMP.** Aktivace receptorů BMPRI/II aktivuje SMAD proteiny, které tvoří proteinový komplex SMAD 1/5/8 s ko-SMAD-4, který směřuje do jádra a spouští cílové geny. BMP ligandy se mohou uvolňovat v parakrinním a autokrinním sledu. Převzato z (Carreira et al. 2014).

### 1.3.5.2 FGF

Pro regulaci proliferace chondrocytů a zahájení jejich hypertrofie má význam rodina signalizačních proteinů FGF navazující se na receptory fibroblastového růstového faktoru 1 (FGFR1) a 2 (FGFR2).

FGFR1 a FGFR2 jsou oba exprimovány v kondenzujícím mezenchymu, který se bude posléze diferencovat do chondrocytů. FGFR1 je exprimován v hypertrofních chondrocytech a nedostatek FGFR1 vede k přechodnému zvýšení hypertrofické zóny (Jacob et al. 2006). FGFR2 je při kondenzaci mezenchymu nejprve exprimován při vysokých koncentracích a zdá se, že je během proliferace chondrocytů podregulován (Ornitz and Marie 2002). Navíc, pokud dojde ke ztrátě FGFR2, má to za následek postnatální dwarfismus se sníženou šířkou hypertrofické zóny (Yu et al. 2003). FGFR3 je exprimován u proliferujících chondrocytů, reguluje buněčný růst a diferenciaci a je v hypertrofické zóně snížen. Aktivace mutace v FGFR3 inhibuje proliferaci chondrocytů a zahájení hypertrofie chondrocytů, ale zrychluje pozdější hypertrofickou diferenciaci.

Přestože ligandy FGF podílející se na vývoji svalů byly dobře charakterizovány, pouze u FGF9 a FGF18 byl prokázán vliv na vývoj chrupavky. FGF9 přímo i nepřímo podporuje proliferaci chondrocytů a hypertrofii v jejích počátečních stádiích a reguluje vaskularizaci v pozdějších stádiích endochondrální osifikace (Jacob et al. 2006; Hung et al. 2007). Signalizaci FGF18 je v počáteční fázi podporována jak proliferace, tak i zahájení hypertrofie chondrocytů a u starších embryí dochází k blokaci proliferace chondrocytů a zpomalení hypertrofie chondrocytů.

#### 1.3.5.3 IGF-1

Kromě růstových faktorů z rodiny TGF $\beta$  a FGF se chondrogenese účastní i inzulinu podobný růstový faktor 1 (IGF-1). Náleží do rodiny IGF proteinů, spolu s dalšími 5 ligandy – proteiny vázající růstový faktor podobný inzulinu (IGFBPs). Navazují se na receptor inzulinu podobného faktoru I a II. (IGF-I, IGF-II), do této rodiny se řadí i IGFBP proteázy (Agrogiannis et al. 2014). Pro IGF-1 signalizaci je důležitý transmembránový glykoprotein IGF-1R s tyrosinkinázovou aktivitou. Ten dokáže vázat IGF-1 asi o 20x lépe, než receptor IGF-II. Pokud IGF-1 nebyl přítomen během chondrogenese u myší, došlo ke zmenšení velikosti hypertrofních chondrocytů (Wang, Zhou, and Bondy 1999).

### 1.4 TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ

Tkáňové inženýrství je mezioborová vědecká disciplína. Jejím základním cílem je připravit novou, biologicky ekvivalentní tkáň, nebo i orgán. Nová tkáň se vytváří kultivací odebraných buněk pacienta *in vitro* na vhodných materiálech označovaných jako nosiče (ang. scaffold). Následně se tato nově vytvořená tkáň implementuje do organismu, za účelem regenerace nebo nahrazení poškozené tkáně či orgánu.

Druhým přístupem jak regenerovat poškozenou, nebo chybějící tkáň, je aplikovat do místa poškození samotný nosič. Nosič v místě defektu stimuluje buňky z okolní tkáně, aby do něj migrovaly, proliferovaly a diferenciovaly a tím tvořily novou ECM a potažmo tkáň. Tento tzv. „bezbuňčný přístup“ je výrazně levnější, odpadá zákrok spojený s izolací. Vytváří ale značné nároky na vytvoření kvality nosiče.

Tkáňové inženýrství nabízí potenciál v léčbě osteochondrálních defektů, které se často léčí nahrazením kloubu totální endoprotézou. Vzhledem k nízké regenerační schopnosti chrupavky tak představuje tkáňové inženýrství nový přístup k léčbě osteochondrálních defektů s cílem zajistit plnou obnovu struktury a funkce původní tkáně.

### 1.4.1 SOUČASNÁ LÉČBA DEFEKTŮ CHRUPAVKY

Defekty chrupavky jsou velmi běžné. Procento lidí s defekty kloubní chrupavky (způsobených úrazy, sportovní zátěží či degenerací tkáně ve vyšším věku) se zvyšuje na celém světě a její léčba je náročná. Díky své nízké regenerační kapacitě má i omezené možnosti samoobnovy a znovunabytí své původní funkce. Například každý rok postihne zranění kloubů 900 000 Američanů. Z artroskopie (metoda vyšetření) kolenního kloubu u 31 516 pacientů s průměrným věkem 47 let bylo zjištěno, že u 63 % pacientů byl přítomen chondrální defekt, z nichž 5% bylo mladších 40 let (Curl et al. 1997). V jiné studii z 1000 arthroscopií u pacientů s průměrným věkem 39 let byl osteochondrální defekt nalezen u 61% pacientů (Hjelle et al. 2002).

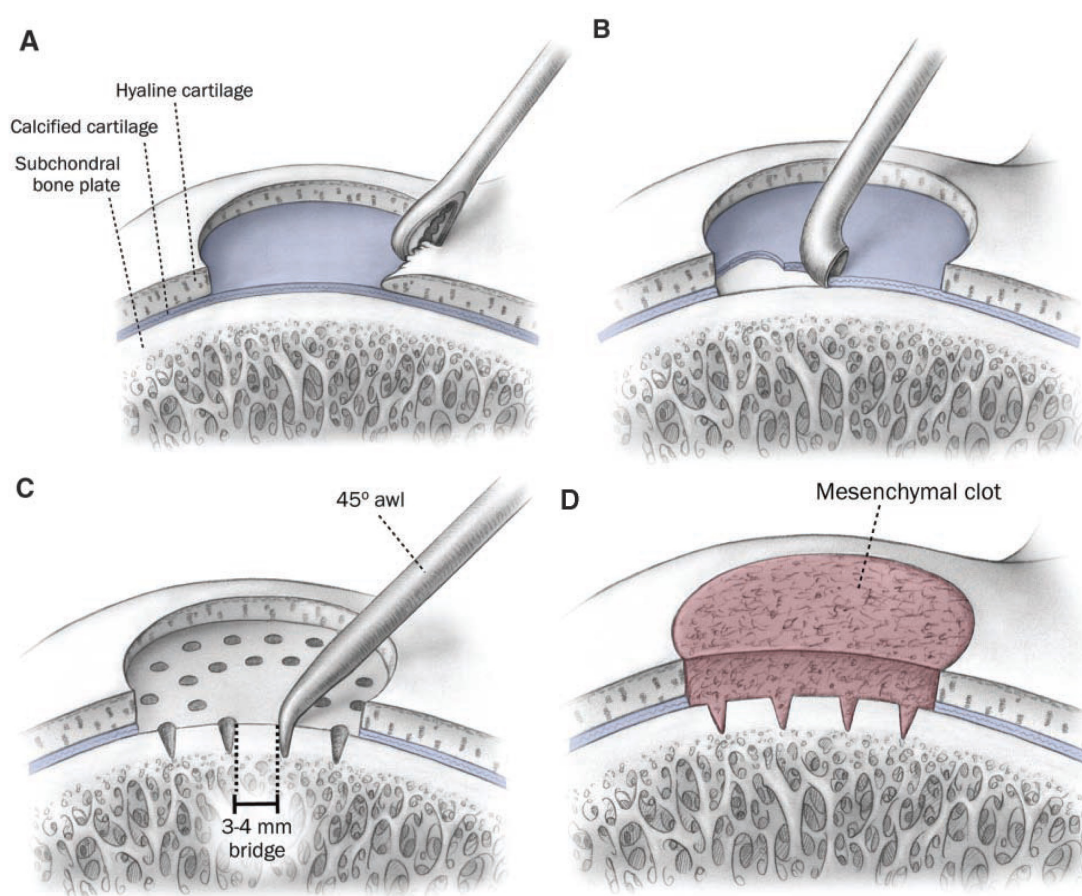
Kloubní chrupavka prochází v průběhu života degenerací. Ve vyšším věku trpí pacienti osteoartritidou, což je degenerativní onemocnění projevující se bolestí a ztuhlostí kloubů. Bolest se projevuje kvůli zasažení okolních tkání, chrupavka samotná není inervována, a proto u jejího poškození není bolest pociťována. U osteoartritidy dochází k otoku a ke snížení mechanické funkce chrupavky. Jedná se o nejčastější onemocnění kloubů. V roce 2010 trpělo osteoartritidou kolene 3,6% světové populace, což je 250 milionů lidí a osteoartritidou kyčle 0,85% světové populace (59 milionů). Vyšší prevalence onemocnění je u žen a u populace s obezitou (Cross et al. 2014).

Jedna z metod obnovení funkce kloubů postiženého osteoartritidou je operace kloubní náhrady. Metoda zajišťuje obnovení funkce tkáně a zároveň je finančně dostupná. Začala se poprvé praktikovat mezi lety 1970 a 1980 a je dodnes velmi efektivní. Operace se však doporučuje jedincům mladším 55 let. Úspěšná operace také závisí na vhodnosti dárce (Carr et al. 2012). Operace se obecně doporučuje spíše v pozdní fázi osteoartritidy. V prvotní fázi je možné důsledky redukovat léky či snížením hmotnosti pacienta a snížením zátěže vyvíjené na chrupavku (Buckwalter and Mankin 1998a).

Hlavními metodami reparace defektů chrupavky jsou kloubní náhrady, či tkáňové štěpy. Mezi alternativní přístupy patří mikrofraktury, implantace autologních chondrocytů (ACI) z těla pacienta do defektu. Tato implantace může být také podpořena implantovaným nosičem, který napomáhá autologním chondrocytům v dalším růstu a diferenciaci (MACI).

#### 1.4.1.1 MIKROFRAKTURY

Při defektu chrupavky je potřeba zajistit vhodné prostředí napomáhající regeneraci, neboť k samoobnově dochází pouze minimálně. Možnost iniciace chondrogeneze a regenerace defektu nabízí tvorba tzv. „mikrofraktur“. Jedná se o často používanou, minimálně invazivní techniku s minimálními riziky. Tato technika spočívá ve vytvoření mnoha malých otvorů do subchondrální kosti, vzdálených od sebe asi 3-4 mm, viz obr. č. 10 (C). Tím je umožněno MSC z kostní krve migrovat do místa defektu a diferencovat do chondrocytů. Výhodou tedy je, že regenerace probíhá *in situ* v pacientovi (Steadman, Rodkey, and Briggs 2002).



**Obr č. 10 – Regenerace chrupavky pomocí mikrofraktur.** A – nejprve se odstraní část kloubní chrupavky a očistí okraje rány; B - opatrně se odstraní kalcifikovaná vrstva chrupavky; C – Do subchondrální kosti se vytvoří homologní mikrofraktury 3-4mm od sebe; D – po migraci MSC do místa defektu se vytvoří ukotvená mezenchymální zátka. Převzato z (Mithoefer et al. 2009).

Nevýhodou této metody je především to, že nevede ke vzniku plnohodnotné hyalinní chrupavky. MSC vytváří v defektu fibrózní hybridní chrupavku, která nemusí vyplňovat celý objem defektu. Ve 28 klinických studiích u 3122 pacientů došlo ke zlepšení funkce kolenního

kloubu po 24 měsících od zákroku, v delším časovém úseku se však data lišila a efekt byl spíše nedostatečný (Mithoefer et al. 2009). Mikrofraktury dokáží tedy vytvořit vynikající krátkodobou funkční náhradu kloubní chrupavky, ne však z dlouhodobého hlediska (Mithoefer et al. 2009).

#### **1.4.1.2 OSTEOCHONDRÁLNÍ AUTOGRAFT**

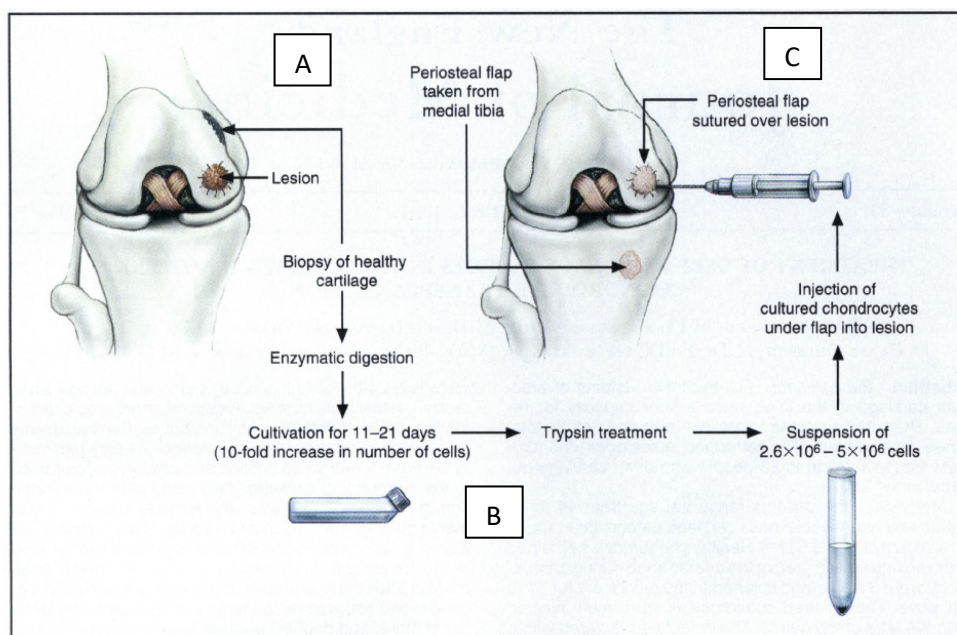
Pro navození regenerace chrupavky z dlouhodobějšího hlediska se využívají osteochondrální autografty. Principem této metody je vyplnění defektu pomocí cylindrických osteochondrálních autograftů odebraných pacientovi z jiné, nezářezové, části kloubu (Hangody et al. 2008). Tato metoda je vhodná pro regeneraci malých, či středně velkých defektů, nacházejících se v zátěžových částech kloubu.

Ve studii Hangodyho a kol., byl sledován efekt léčby pomocí osteochondrálního autograftu u 1000 jedinců různých druhů (pes, kůň, člověk). Po 15 letech od zákroku s původním malým či středně velkým defektem vykazovali jedinci 92% zlepšení regenerace původního defektu (Hangody et al. 2008).

#### **1.4.1.3 IMPLANTACE AUTOLOGNÍCH CHONDROCYTŮ**

Zajímavý potenciál v léčbě hlubokých chondrálních defektů představuje metoda ACI. Ta sestává ze 2 kroků. Nejprve se provede biopsie z chrupavky pacienta mimo defekt. Po enzymatickém rozvolnění ECM chrupavky se chondrocyty kultivují *in vitro* do potřebného množství. Po rozvolnění trypsinem jsou stočeny a injekcí implantovány do místa defektu viz obr. č. 11 (Brittberg et al. 1994).





**Obr. č. 11 – Transplantace autologních chondrocytů:** Nejprve se biopsií odebere chrupavka (A), buňky se kultivují *in vitro* (B) a injekčně vloží do místa defektu (C). Převzato z (Brittberg et al. 1994).

Nevýhodou kultivace buněk *in vitro* mohou být mutace a další změny, které posléze mohou způsobovat problém při vložení zpět do těla pacienta, možnost snížení vedlejších efektů nabízí kultivace autologních chondrocytů v autologním séru (Brittberg et al. 1994).

Ve studii s 23 pacienty s hlubokým chondrálním defektem (o ploše 1,6 - 6,5 cm<sup>2</sup>) a věkovým rozmezím 14-48 let byl zkoumán efekt metody ACI z dlouhodobého hlediska. Po 2 letech od operace se u 14 ze 16 pacientů s defektem v kolenní chrupavce znovuobnovila funkce kloubu. Nová chrupavka byla podobná fyziologické chrupavce a syntetizovala kolagen II. U 7 pacientů s defektem v česce došlo k znovuobnovení funkce kloubu, u zbylých 5 došlo pouze k zlepšení (Brittberg et al. 1994).

#### 1.4.1.4 NOSIČEM INDUKOVANÁ IMPLANTACE AUTOLOGNÍCH CHONDROCYTŮ (MACI)

MACI® je technika schopná regenerace chrupavky, která se používá od roku 2000 (M.-H. Zheng et al. 2007). Využívá operativně vložených autologních chondrocytů v kombinaci s nosičem, který je většinou ve formě membrány/3D matrix z různých materiálů. (Chondro-Gide, Geistlich Biomaterials, Wollhusen, Switzerland).

Při studiu 56 pacientů po MACI zákroku, kde byla jako matrice použita membrána z kolagenu typu I/III, byla na membráně pozorována vrstva chondrocytů, které byly velmi dobře začleněny do matrice a vykazovali fenotyp typický pro chondrocyty, jako je sférická



morfologie, či syntéza chondrogenních markerů – kolagenu typu II, agrekanu a exprese S-100. Již po 6 měsících od zákroku byla pozorována regenerace 75% kloubní chrupavky v defektu. Bylo tedy prokázáno, že MACI představuje zajímavou alternativu v léčbě chrupavky. Při implementaci autologních chondrocytů do králíků, u nichž byla jako matrice použita dvouvrstevná kolagenní membrána Chondro-Gide nabízela tato matrice stabilní mikroprostředí pro integraci chondrocytů do matrice a jejich proliferaci, rovnoměrnou distribuci a zabráňovala úniku buněk z místa defektu (M.-H. Zheng et al. 2007).

#### **1.4.2 TKÁŇOVÉ NOSIČE**

Chirurgické postupy často vedou pouze k formaci vláknité tkáně. Pro úplné obnovení složité struktury hyalinní chrupavky a zajištění funkce celého kloubu je nutno nacházet další možnosti léčby a terapie. Slibnou možností regenerace s využitím chondrogenního potenciálu autologních buněk je metoda ACI a MACI, na níž plynule navazuje i výzkum dalších typů materiálů, které by poskytovaly vhodné prostředí pro růst chondrocytů. K těmto biomateriálům, s využitím v tkáňovém inženýrství chrupavky, řadíme především hydrogely, jejich kompozity s nanovláknny a nanovláknna samotná (Berninger et al. 2013).

##### **1.4.2.1 BIOMATERIÁLY**

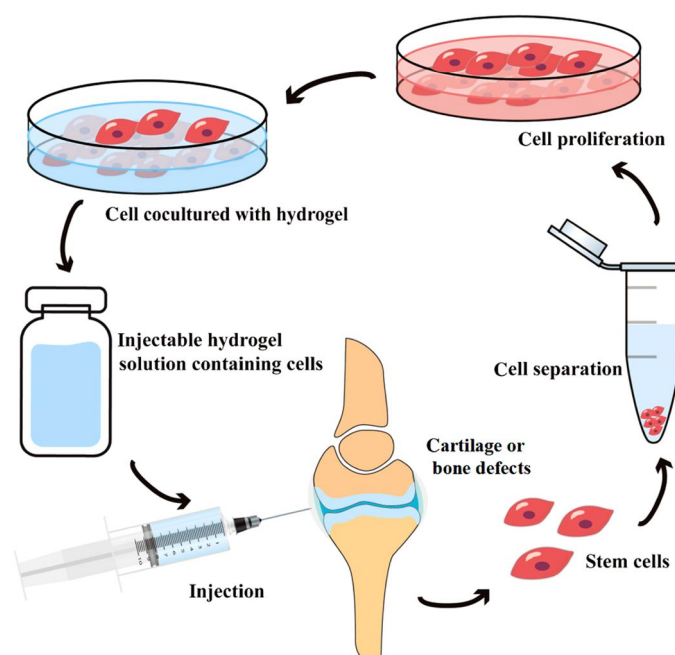
Jako biomateriál se označuje materiál pro kultivaci buněk v regenerativní medicíně, který musí splňovat množství podmínek. Materiál by měl umožňovat tvorbu 3D struktur. Porozita nosiče by měla být minimálně 90%, aby byla zajištěna dostatečná plocha pro buněčnou interakci s nosičem, tvorbu ECM, difuzi živin a odvod odpadních látek z nosiče. Proto by měly být póry v nosiči navzájem propojené. Buňky by při kultivaci *in vitro* měly ochotně adherovat na povrch nanovláken a dále proliferovat. Dále by buňky měly snáze diferencovat do buněčné linie našeho zájmu a v ní i nadále setrávat. V prostředí *in vivo* by měl být nosič schopen napomáhat migraci buněk do rány, jejich adhezi na nosič, růst a diferenciaci. Ideálně by se nosič měl posléze i rozpadat působením enzymů reorganizujících mezibuněčnou hmotu ve tkáni a vytvářet prostor pro nově vytvořenou tkáň. Polymer, ani produkty jeho degradace by neměly být toxické a neměly by vyvolávat zánět po implantaci *in vivo*. Úroveň rozkladu nosiče by měla být volitelná, aby odpovídala rychlosti syntézy nové ECM (Griffith and Naughton 2002; Freed et al. 1994; Vert et al. 1992).

#### 1.4.2.2 HYDROGELY

Hydrogel je trojrozměrná síť hydrofilních polymerních řetězců, na které je navázán vysoký obsah vody. Svou strukturou tedy připomíná ECM chrupavky. Na přípravu hydrogelů v tkáňovém inženýrství se používají přírodní a syntetické polymery. Hydrogely z přírodních polymerů jako kolagen, želatina, alginát, chitosan a HA mají horší mechanické vlastnosti, ale výbornou biokompatibilitu. Hydrogely připravené ze syntetických polymerů jsou na tom opačně, mají lepší mechanické vlastnosti, ale nižší biokompatibilitu (M. Liu et al. 2017).

Hydrogely mohou být různě viskózní, a jejich viskozita se zvyšuje vzájemným propojením polymerních řetězců, tedy zesítováním (ang. crosslinking). Energie k zesítování polymerních řetězců může být dodána například fotony ultrafialového (UV) záření (Schuurman et al. 2013) a (nebo) chemickou vazbou síťovacího činidla, většinou bifunkční chemickou látkou (Zheng Shu et al., n.d.). Sítování chemickými látkami často výrazně snižuje biokompatibilitu hydrogelového nosiče. Proto je mnohem výhodnější použít na propojení polymerních řetězců enzym (Teixeira et al. 2012). Tyto biokatalyzátory lze téměř výlučně použít jen na přírodní polymery.

Jiným typem hydrogelů jsou hydrogely na bázi peptidů. Změna pH nebo koncentrace iontů v hydrogelu vede k samorganizovanému skládání peptidů do větších celků. To se projevuje zvýšením viskozity a mechanické pevnosti gelů (Kisiday et al. 2002).



**Obr. č. 12 - Schéma léčby defektů chrupavky pomocí injikovatelného hydrogelu. Převzato z (M. Liu et al. 2017).**

V současné době se pozornost soustřeďuje na vývoj hydrogelů, které lze laparoskopicky nebo pomocí jiného mini-invasivního chirurgického zákroku injikovat do hyalinní chrupavky (viz obr. č. 12). Jedná se však o značnou výzvu. Ideální biokompatibilní a biodegradabilní nosič z hydrogelu by se totiž měl snadno injikovat do místa defektu v kloubu, kompletně zaplnit prostor defektu, ztuhnout a zůstat v defektu. Zároveň musí podpořit růst a diferenciaci buněk chrupavky (M. Liu et al. 2017).

Hydrogely mohou iniciovat chondrogenezi *in vivo*. MSC z kostní dřeně byly např. enkapsulovány do hydrogelu na bázi kolagenu a při implantaci u králíků vznikaly homogeně distribuované chondrocyty produkující ECM chrupavky (L. Zheng et al. 2010).

### 1.4.3 NANOVLÁKNA

V tkáňovém inženýrství se jako jeden z typů materiálu využívají nosiče z nanovláken. Nanovlákná jsou definována tak, že je jejich průměr menší než 1 mikrometr, obvykle v rozmezí několika desítek až stovek nanometrů. Nanovlákná mají vysoký specifický povrch, neboli vysoký poměr povrchu a objemu. Díky tomu se rapidně zvyšuje schopnost difuze molekul z povrchu nanovláken a také jejich reaktivita s dalšími látkami. Vysoká porozita, je výhodná pro snadnou difuzi látek mezi nosičem a prostředím (Ramakrishna et al. 2005).

V oblasti biomedicíny je možné využít vysokou porozitu nanovláknenných vrstev pro snadnou difuzi živin, diferenciačních faktorů a dalších rozpustných složek a zároveň odvádět

zplodiny buněčného metabolismu z nosiče. Při větší velikosti pórů mohou nanovláknenné vrstvy umožňovat i prorůstání buněk i do hlubších vrstev nosiče a ty nemusí růst pouze na jeho 2D povrchu (Lu 2016). Schopnost tvořit vedle 2D povrchů i 3D struktury nabízí nové možnosti v regeneraci širšího spektra tkání (Bhardwaj and Kundu 2010; Sill and von Recum 2008). Nanovláknenné nosiče svou strukturou napodobují ECM, hlavně velikostí a tvarem vláken.

Nanovláknna mohou být dále funkcionalizována, tedy modifikována chemickými látkami navázanými na jejich povrch, nebo obsaženými v struktuře nanovláken. Tato funkcionalizace může napomáhat lokálnímu dodávání látek typu vitamínů a růstových faktorů do místa defektu nativní tkáně. Tím se podporuje diferenciaci buněk adheovaných na nosiči do buněk nově vytvořené tkáně.

Navázání látek na povrch je možno buď metodou přímé fyzikální adsorpce. Tato metoda nese riziko rychlejší difuze chemické látky z povrchu, ale rychlost bude nižší, než kdyby byla látka přimíchána přímo do média. Např. podle Nie et. al (2008), při adsorpci BMP-2 na povrch nanovláken, došlo k uvolnění 75 % již za 5 dní (Nie et al. 2008). Další metodou navázání látek na povrch je vytvoření kovalentních vazeb mezi látkou a molekulou polymeru na povrchu (Buzgo et al. 2015). Výhodou je pomalejší difuze při srovnání s metodou přímé fyzikální adsorpce. Nevýhodou je často použití vysoce reaktivních a toxických chemických látek. Tím se může snižovat biokompatibilita materiálu a schvalitelnost materiálu pro biomedicínské použití.

#### 1.4.3.1 KOAXIÁLNÍ NANOVLÁKNA

Možnost trvalejšího uvolňování látky po delší dobu nabízí tvorba tzv. koaxiálních (či jádro-plášťových) vláken (Yarin 2011). Mohou být vytvořena ze dvou polymerů, kdy jeden tvoří jádro a nachází se uvnitř a druhý tvoří jeho obal/plášť a nachází se na povrchu. Bioaktivní látku je možné enkapsulovat do jádra nanovláknna. V tomto případě je rychlost uvolňování látky z jádra nanovláknna do média určována rychlostí degradace plášťového polymeru. Ideální je dodávat bioaktivní látku v průběhu celého trvání buněčného experimentu. Látky by se měly postupně uvolňovat v předem stanoveném sledu (Agarwal, Wendorff, and Greiner 2008). Koaxiální nanovláknna lze připravovat z polymerů elektrostatickým či centrifugačním zvlákňováním.

#### 1.4.3.2 KOMPOZITY

Kombinací různých typů materiálu pro kultivaci buněk chrupavky je možné připravit nový typ materiálu, který kombinuje výhodné vlastnosti předchozích typů, respektive eliminuje jejich slabé stránky. Většinou se jedná o kombinaci nanovláken a hydrogelů. Nevýhodou materiálu z nanovláken je jeho 2D struktura, u hydrogelů zase často nízká mechanická pevnost. Příkladem je použití hydrogelu a nanovláken (Formica et al. 2016), kde plazmaticky modifikované PCL nanovlákná mechanicky zpevnily alginátový hydrogel. PCL vlákna navíc obsahovaly DEX pro navození a udržení chondrogenese.

#### 1.4.3.3 POLYMERY

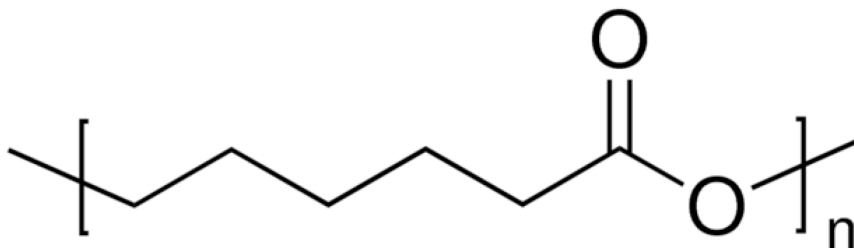
Pro tvorbu nanovláknenného materiálu můžeme použít polymery přírodního či syntetického původu. Obě skupiny nabízí řadu výhod i rizik a je proto nezbytné nejprve pochopit vlastnosti tkáně, kde má nosič krátkodobě zastoupit mezibuněčnou hmotu mechanicky podporující růst nových buněk. Materiál pro tvorbu nosiče s využitím v tkáňovém inženýrství by měl splňovat několik požadavků. Měl být biokompatibilní a biodegradabilní či bioresorbovatelný. Biokompatibilní materiál by neměl v těle vyvolávat imunitní reakci, měl by být vhodně zvolen s ohledem na jeho degradaci, která může vyvolávat interakci s imunitním systémem. U biodegradabilního pevného materiálu by degradace měla vést k tvorbě meziproductů s nižší molekulární vahou. Ty se uvolňují do těla a měl by být zvážen účinek vedlejších produktů rozkladu na hostitelský organismus. U pojmu biodegradabilní nemáme jasný důkaz o eliminaci látky z těla. Pokud by docházelo k úplné eliminaci původně vloženého pevného materiálu do *in vivo* prostředí (neboli k jeho resorpci), označoval by se materiál jako bioresorbovatelný. Takový materiál by velmi účinně degradoval a vytvářel meziproducty bez vedlejších efektů eliminované z těla přirozenými procesy (byly by metabolizovány apod.) (Vert et al. 1992). Polymery využitě na buněčné testování s budoucí intencí terapeutického využití musí být také legislativně schváleny pro biomedicínské použití úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA).

Mezi polymery přírodního původu patří želatina, kolagen, chitosan, fibroin, alginát apod. Ty jsou produkovány různými organismy. Jejich výhodou je hlavně vysoká biokompatibilita a biodegradabilita. Hlavním problémem použití polymerů přírodního původu je špatná reprodukovatelnost vlastností polymerních řetězců – hl. molekulární vahy a relativního zastoupení funkčních skupin. Další nevýhodou přírodních polymerů může být

nízká mechanická pevnost a vyšší rychlost degradace, musí být tedy zpevněny zesíťováním nebo tvorbou kompozitů s jinými materiály (Dietmar Werner Hutmacher et al. 2007). Mezi syntetické polymery patří např. polyvinylalkohol (PVA), polyglykolová kyselina (PGA), polymléčná kyselina (PLLA), kopolymer kyseliny polymléčné a polyglykolové (PLGA), PCL apod. Nevýhodou syntetických polymerů je vyšší cena (D W Hutmacher 2000).

### ***POLY-ε-KAPROLAKTON (PCL)***

PCL používaný v této práci je synteticky vyrobený alifatický polyester, který se skládá z opakujících se hexanoátových podjednotek (viz obr. č. 13). Je možné ho studovat a využít v humánní medicíně, je schválený pro biomedicínské použití úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA). Jedná se o hydrofobní materiál rozpustný v organických rozpouštědlech a organických kyselinách (chloroform, aceton, směs kys. mravenčí a kys. octové), s jejichž pomocí ho lze i zvláknit (nejčastěji používaný je chloroform) (Luo, Stride, and Edirisinghe 2012).



**Obr. č. 13** – Chemická struktura PCL (zdroj Sigma Aldrich)

Biodegradovatelné polymerní materiály jsou v těle degradovány pomocí spektra mechanismů, mechanismy degradace ještě nejsou zcela známy. Nejčastěji se jedná o enzymatickou degradaci (např. lipázy, proteázy, esterázy) (D. . Chen, Bei, and Wang 2000) nebo působením volných radikálů (např. peroxid vodíku) (Ali, Doherty, and Williams 1994). PCL na rozdíl od jiných biodegradabilních polymerů degraduje pomaleji (Sun et al. 2006). V *in vivo* studii degradace PCL (na myším modelu) po dobu 3 let, zůstávaly PCL kapsle intaktní 2 roky po implantaci. Molekulová hmotnost PCL se v čase snižovala, PCL kapsle se rozdělily na malé kousky, které byly dále metabolizovány. PCL se neakumuloval v žádných orgánech a byl vyloučen z těla močí a výkaly (Sun et al. 2006).

Biokompatibilita a biodegradabilita PCL byla testována na mnoha buněčných studiích *in vitro* a *in vivo* (Tay et al. 2005). Během 6 měsíců se na králičím modelu

neprojevovaly nežádoucí účinky mezi PCL a hostitelskou tkání, což poukázalo na dobrou biokompatibilitu PCL. Nosič vyrobený z tohoto polymeru napomohl např. při léčbě kýly vytvořené řezem u miniaturních prasat, kde často použitý materiál představuje pro tělo v podstatě cizí těleso. V případě PCL v kompozitu s polypropylenem (PP) vloženým do rány podpořil až nadměrný růst tkáně, která kolem implantátu vytvořila vláknitou desku a ránu uzavřela pružnou jizvou (East et al. 2018). Předběžně byl PCL testován i v 2 leté studii králičích defektů o kritické velikosti, kde se projevila jejich dlouhodobá biokompatibilita a systém se zdá být nadějný pro kostní regeneraci (Lam et al. 2009).

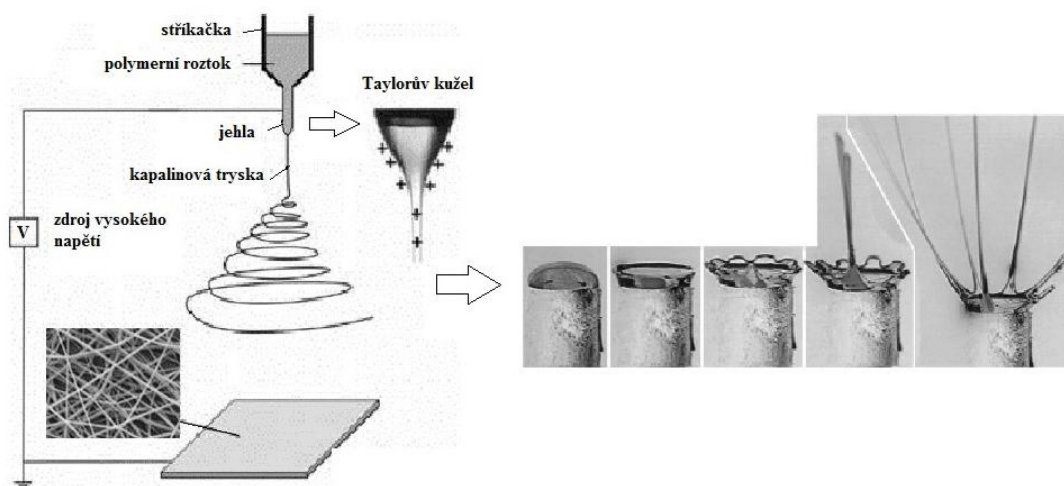
PCL nanovláknenné nosiče již byly kultivovány s primárními chondrocyty např. v médiu obsahujícím ITS, chondrocyty zde udržovaly svůj diferencovaný fenotyp a syntetizovaly typické ECM chrupavky jako kolagen II a agrekan (Garcia-Giralt et al. 2008b). PCL se jeví jako vhodný polymer pro dlouhodobé uvolňovací studie léků (Sun et al. 2006) a tvorbu nanovláknenných nosičů pro tkáňové inženýrství chrupavky. PCL nanovláknenný nosič lze připravit několika metodami.

#### **1.4.3.4 METODY PŘÍPRAVY NANOVLÁKEN**

Pro přípravu nanovláken se používají metody fyzikální adheze, směsného zvlákňování, elektrostatického zvlákňování a centrifugačního zvlákňování. Koaxiální nanovláknena se vytváří metodami elektrostatického a centrifugačního zvlákňování.

#### **1.4.3.5 ELEKTROSTATICKÉ ZVLÁKŇOVÁNÍ**

Nejběžnější metodou přípravy nanovláken je v současné době elektrostatické zvlákňování (ang. electrospinning). Vláknena jsou tvořena pomocí elektrostatických sil z přírodních či syntetických polymerů. Aparatura obsahuje zdroj vysokého napětí a 2 elektrody – zvlákňovací a kolektorovou. Kapka polymerního roztoku se nachází na zvlákňovací elektrodě. Působením elektrického pole vzniká nabitý proud polymerního roztoku. V tomto okamžiku působí na kapku síly povrchového napětí, které udržují její tvar, zároveň však síly elektrostatické, které ji z tohoto tvaru vychylují a přitahují ji k opačně nabitě kolektorové elektrodě. Stav, kdy se síly povrchového napětí rovnají silám elektrostatickým, se říká tzv. Taylorův kužel. Pro překročení tohoto stavu se musí překročit mezní hodnota elektrického pole, poté elektrostatické síly převládnu a z kapky tryskají polymerní proudy směrem ke kolektoru viz obr. č. 14 B. (Li and Xia 2004; Yoo and Kim 2009; Lukáš et al. 2009).



**Obr. č 14 – schéma elektrostatického zvlákňování (A), tvorba Tyalorova kužele z kapky polymeru (B).**  
Upraveno z (Li and Xia 2004; Lukáš et al. 2009).

U elektrostatického zvlákňování dochází např. při použití nižší koncentrace polymeru k vytvoření malých kapiček místo vláken (tzv. elektrospraying), je tedy nutno zvýšit koncentraci polymeru, abychom docílili prodloužení vláken a uchování zvlákněné látky v jeho jádře (Bhardwaj and Kundu 2010). Jednotlivé parametry jsou však u této metody poměrně prostudované, takže v případě defektu je možné parametry modulovat a docílit brzy požadované morfologie vlákna.

Polymer je obvykle rozpuštěn ve směsi rozpouštědla, které napomůže tomu, že během dráhy ke kolektoru se polymerní tryska vysušuje a suchá vlákna jsou poté zachytávána na kolektoru. Zvlákňování může být jehlové a bez jehly. Při jehlovém je polymerní roztok uzavřen v injekční stříkačce, kdy na konci jehly vzniká polymerní kapka, u bezjehlového zvlákňování se polymerní proudy mohou vytvářet i na hladině polymerního roztoku. Bezjehlové zvlákňování je výrazně efektivnější, trysek se za stejný čas může tvořit mnoho (Lukas, Sarkar, and Pokorny 2008). U nanovláken lze ovlivnit aspekty jako např. jejich průměr, materiálové složení, prostorové uspořádání a výslednou porozitu modulací faktorů jakými jsou vybraný polymer a rozpouštědlo (a použitý poměr), napětí proudu, vzdálenost od kolektoru, koncentrace polymeru apod (Z.-M. Huang et al. 2003).

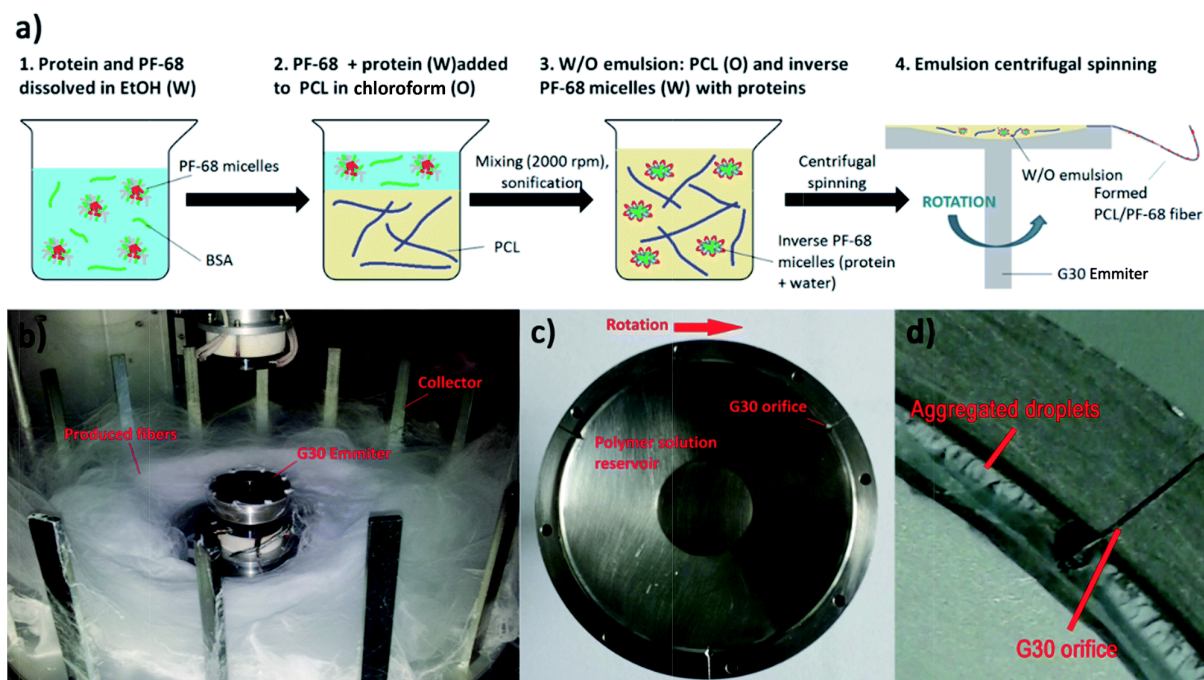
Tato metoda má i přes své rozšíření v oblasti produkce nanovláken své limity, jedním z hlavních je např. nízká výtěžnost. Další nevýhodou je omezený výběr rozpouštědel. Při zvláknění polymeru se musí použít rozpouštědla se správnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, jakými jsou např. elektrická vodivost. Často to nejvhodnější rozpouštědlo pro daný polymer je vysoce toxické, což snižuje biokompatibilitu materiálu. Nannovlákněné vrstvy připravené metodou elektrostatického zvlákňování mají navíc obvykle malý průměr



pórů, což zamezuje infiltraci buněk dovnitř nosiče a buňky tak mohou růst jen na povrchu. Z těchto důvodů se hledají alternativní způsoby zvlákňování.

#### 1.4.3.6 Odstředivé zvlákňování

Alternativní metodu přípravy nanovláken představuje odstředivé (označováno také jako centrifugační zvlákňování, ang. forspinning), což je nová metoda v tkáňovém inženýrství. Nanovlákná jsou tvořena z polymerního roztoku, který je vytlačován úzkou drážkou z rotujícího rezervoáru s využitím odstředivých sil. Formovaná vlákna jsou za letu prodlužována, rozpouštědlo je odpařeno a vlákna jsou zachytávána ve vrstvách na kolektoru viz obr. č. 15 (Padron et al. 2013).



Obr. č. 15 – Princip koaxiálního centrifugačního zvlákňování (Buzgo et al. 2017).

Při odstředivém zvlákňování lze zvlákňovat polymerní roztoky či taveniny z vodivých i nevodivých látek (Zander 2015), čímž odpadá nutnost použití některých toxických rozpouštědel (Sarkar et al. 2010; Padron et al. 2013). Metoda odstředivého zvlákňování nabízí rovněž zvýšení produktivity zvlákňování a snížení nákladů (X. Zhang and Lu 2014).

Velkou výhodou odstředivého zvlákňování je nezávislost na elektrických parametrech polymerního roztoku, jakou je např. elektrická vodivost. Odstředivým zvlákňováním je možné

vytvořit více poróznější vrstvy s 3D strukturou materiálu. Mimo jiné, vyšší porozita či 3D struktura nosiče představují vlastnosti skýtající potenciál při chondrogenní a osteogenní regeneraci. Svoji 3D strukturou se nosič vytvořený odstředivým zvlákňováním podobá více struktuře ECM tvořené chondrocyty, než nosič vytvořený elektrostatickým zvlákňováním. Větší průměr mezi-vláknenných pórů umožňuje lepší pronikání buněk do nosiče (Lu 2016).

V naší laboratoři byly vytvořeny nosiče pro studium penetrace prasečích MSC (Rampichová et al. 2014).

U odstředivého zvlákňování je výzkum parametrů teprve v počátcích, odstředivá síla má rovněž někdy za následek tvorbu emulzních kapek látky a jejich oddělení z jádra nanovláknů (Dabirian et al. 2011). Je tedy potřeba studovat jednotlivé parametry pro docílení ideální struktury vlákna. Parametry u odstředivého zvlákňování jsou oproti elektrostatickému zvlákňování především použita odstředivá síla, dále viskozita roztoku, průměr drážky, kde se formuje nanovláknů a vzdálenost od kolektoru (Sarkar et al. 2010).

#### 1.4.3.7 FUNKCIONALIZACE NANOVLÁKEN

Je možné vytvořit i tzv. koaxiální či emulzní vlákna, vlákna o nanorozměrech, do kterých je možné enkapsulovat bioaktivní látky, léky či jiné malé molekuly, které se z vláken mohou postupně uvolňovat na základě jejich rozpadu. Bioaktivní látka je tak chráněna v průběhu procesu zvlákňování i později před enzymy v mikropřítředí nosiče v případě operativního vložení nosiče do rány.

Hlavním cílem výzkumů těchto nosičů je prodloužení doby uvolňování látky do okolního mikropřítředí. Obecně jde o to vytvořit systém, který bude do lokální rány ve správných časových intervalech dodávat správnou koncentraci růstových faktorů a dalších látek působících na buňky pacienta i buňky implantované stimulovat je do chondrogenní diferenciaci a tím efektivněji napomáhat regeneraci chrupavky.

Látky lze do nanovláken inkorporovat pomocí metody elektrostatického i odstředivého zvlákňování. U obou metod dochází bohužel i k defektům, kdy se látka může dostat mimo nanovláknů.

Materiály z nanovláken mají skvělé vlastnosti pro kultivaci buněk, ale i přes to se je materiáloví inženýři snaží vylepšovat, například funkcionalizovat. Při funkcionalizaci nanovláken jde především o modifikaci jejich povrchu, který stimuluje buňky k dělení a diferenciaci do fenotypu chondroblastů a chondrocytů. Například Formica et al. 2016

plazmaticky modifikovali povrch PCL, který je hydrofobní a odpuzuje molekuly vody. Kyslík ve formě plazmy se navázal na řetězce polymeru. Povrch vláken se po navázání kyslíku změnil na hydrofilní. Modifikovaný hydrofilní povrch navazuje molekuly vody, a tím představuje pro chondroblasty a chondrocyty mnohem přirozenější prostředí. Vlastní tkáň chrupavky je totiž vysoce hydratovaná a obsahuje až 80% vody.

Lepší stimulaci pro navození chondrogenese lze zajistit přidáním růstových faktorů. Do struktury nanovláken je možné uzavřít různé růstové faktory pro navození chondrogenní diferenciace jako například bFGF (Sahoo et al. 2009). Při rozpadu biodegradabilního nanovlákná se růstové faktory v čase postupně uvolňují a výrazně ovlivňují chování buněk. Některé faktory, jako například TGF- $\beta$ 1 jsou silně mitogenní a buňky odpovídají na tento signál masívním množením. Je tedy nezanedbatelné riziko, že takto stimulovaná populace se může zvrhnout do nádorového bujení. Proto je problém takovýto rizikový postup úspěšně aplikovat do praxe při léčbě pacientů citace.

Do koaxiálních nanovláken připravených elektrostatickým zvlákněním byly také zvlákněny růstové faktory jako např. nervový růstový faktor (NGF) či růstový faktor krevních destiček (PDGF), které si po uvolnění zachovávaly bioaktivitu (Yarin 2011). Z jiných látek byla do vláken vložena antibiotika jako tetracyklin či gentamycin či léky jako resveratrol. Do jádra koaxiálních nanovláken PCL/PVA, kdy polymer PCL byl na povrchu a PVA v jádře, byly zvlákněny i liposomy obsahující i růstové faktory pro navození chondrogenese MSC. Liposomy se zachovávaly během procesu elektrostatického zvláknění, nacházely se v PVA jádře a byly schopné uvolňovat bioaktivní faktory pro chondrogenezi (Mickova et al. 2012)

Druhou možností jak stimulovat buňky je použití trombocytů. Krevní destičky obsahují také autologní růstové faktory a podílejí se na hojení ran a defektů v lidském organismu. Povrch nanovláken lze tedy funkcionalizovat adhezaními trombocyty a pozitivně ovlivňovat chondrogenezi (Rampichová et al. 2017). Krevní destičky, nebo jejich deriváty, je možné také uzavřít do vláken. Byl například vytvořen koaxiální systém PCL/PVA, do jehož jádra byly uzavřeny alfa granule z krevních destiček. Z nich se uvolňovaly růstové faktory, které podporovaly chondrogenezi u MSC a chondrocytů *in vitro* (Buzgo et al. 2013).

Další možností, jak stimulovat buňky je uzavřít do nanovláken chondrogenní suplementy jako je DEX a A2P. Toto cestou se ubírala i tato diplomová práce. Byla použita metoda přípravy nanovláken, a to odstředivé zvláknění.

## 2. MATERIÁL A METODY

### 2.1 CHEMIKÁLIE

Tabulka č. 1: Abecední seznam chemikálií

Název chemikálie	Katalogové číslo	Výrobce
Alexa Fluor 488	A-10667	Invitrogen
Dexamed		Medochemie
3,3'- dihexyloxakarbocyanin jodid - DiOC6(3)	D273	Invitrogen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	D2438	Sigma Aldrich
Kys. ethylendiamintetraoctová (EDTA)	EDS	Sigma Aldrich
Etanol 96%	70390	Penta
Etanol Absolutní	71250	Penta
FBS	F7524	Sigma Aldrich
Hexamethyldisilazan (HMDS)	440191	Sigma Aldrich
IMDM médium	I3390	Sigma Aldrich
Insulin Transferin Selenium X	51500-056	Life technologies
Kolagenáza	NB4G	SERVA
L-askorbát-2-fosfát	A8960	Sigma Aldrich
L-glutamin 200 mM	25030-081	Life Technologies
Metanol p. a.	21210-11000	Penta
MTS	G3581	Promega
RNeasy Mini kit	74106	Qiagen
RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	K1632	Thermo Scientific
Tween-20	P9416	Sigma Aldrich
PCL		
Penicilin/Streptomycin	15140-122	Life Technologies
Propidium jodid	P4864	Sigma Aldrich
Quant- iT dsDNA Assay kit	Q-33120	Thermofisher
Quant-iT TM RNA Assay Kit	Q33140	Invitrogen
Protilátka proti kolagenu II	II-II6B3	DSHB
Triton X-100	T8787	Sigma Aldrich
Trypsin-EDTA	59418C	Sigma Aldrich
Sonda 1	04684974001	Sigma Aldrich
Sonda 15	04685148001	Sigma Aldrich
Sonda 28	04687604001	Sigma Aldrich
Sonda 44	04688040001	Sigma Aldrich
MasterMix: LightCycler® 480 Probes Master	04707494001	Roche

## 2.2 PŘÍSTROJE

Tabulka č. 2: Abecední seznam přístrojů

Přístroj	Výrobní název	Výrobce
Analytické váhy	T5939	Kern
Centrifuga	NF800R	Nüve
Centrifuga	Spectrafuge 24D	Labnet
CO <sub>2</sub> inkubátor	2424-2	Shel Lab
Cycler pro syntézu cDNA	GenePro	BIOER
Cycler pro RT-PCR	Light Cycler 480	Roche
Reader (fluorescenční)	Synergy HT	BioTek
Konfokální mikroskop	LSM 5 DUO	Zeiss
Třepačka	Rotamax 120	Heidolph
Flow box	Safe flow 1.2	Bioair
Forcespin – přístroj na odstředivé zvlákňování	<i>Cyclone™</i> L-1000M/D	Fiberio
Nanodrop	ND1000	Thermo Scientific
Ohřívací Lázeň	NB-301	BioTek
Pokovovací zařízení na SEM	Q 150R ES	Quorum
Skenovací elektronový mikroskop	Vega3	Tescan
Světelný mikroskop	TH4-200	Olympus
Vortex	ZXClassic	VELP Scientifica

## 2.3 PŘÍPRAVA NANOVLÁKENNÝCH PCL NOSIČŮ

Nanovlákná vrstva pro kultivaci chondrocytů byla připravena z poly-ε-kaprolaktonu (PCL) metodou odstředivého zvlákňování (forcespinningu) na přístroji na odstředivé zvlákňování tzv. forcespineru (*Cyclone™* L-1000M/D, Fiberio). PCL (molekulová hmotnost 45000 Da, Sigma Aldrich, 40% hm.) bylo rozpuštěno v roztoku chloroform/etanol v poměru 9:1. Vlákenné vrstvy ze samotného PCL byly použity pro kultivaci chondrocytů v experimentech 1-4.

V případě enkapsulace látek dovnitř vlákených nosičů (pokus č. 5 a 6), byla využita metoda emulzního centrifugačního zvlákňování vyvinutá v naší laboratoři (Vocetkova et al. 2017). Kontinuální fáze byla složená z 40% PCL obdobně jako v případě experimentů 1-4. Tato fáze byla emulzifikována s 5 w/v % vodním roztekem Pluronicu F-68 (Sigma Aldrich) obsahujícím chondrogenní suppleenty A2P, DEX a ITS-X v poměrech uvedených v tabulce č. 3. Zvlákňování vytváří strukturu vláken typu jádro-obal. Bylo vytvořeno 7 skupin koaxiálních PCL nanovlákených vzorků označených jako A1-3, D1-3 a PLM, které obsahovaly stejné

koncentrační poměry suplementů, jako se v experimentech č. 2 a č. 4 testovaly přidávané k chondrocytům do média.

**Tab. č. 3 – Názvy skupin PCL nanovláknenných ploch a koncentrace chondrogenních suplementů nutných pro přípravu vzorku metodou odstředivého zvlákňování**

Vzorek (PCL)	A2P (μg/ml)	DEX (nM)	ITS-X (1%)
A1	25	100	1
A2	50	100	1
A3	100	100	1
D1	50	10	1
D2	50	100	1
D3	50	1000	1
PLM	200	200	2

Směs (samotné PCL/PCL + PF68 + suplementy) byla přelita do rezervoáru přístroje. Rezervoár obsahoval 3 drážky o velikosti G30 a během procesu tvorby vláken rotoval rychlostí 10000 rpm. Polymerní roztok byl tak odstředivými silami vytlačován drážkami ven a vzniklé nanovláknenné PCL sítě se zachytávaly na textilií zvanou spunbound.

Z vytvořené vrstvy byly vyřezány vzorky o velikosti 6 mm. Nosiče byly vysterylizovány ethylenoxidem při teplotě 37°C (Ústřední vojenská nemocnice). Po sterilizaci byly nosiče po krátkou dobu udržovány v exsikátoru. Pokud obsahovala vlákna i koaxiálně zvlákněnou složku, uchovávala se v lednici.

## 2.4 IZOLACE CHONDROCYTŮ

Kloubní chrupavka byla odebrána z kondylu femuru dospělého prasečího jedince po porážce (Jatky Český Brod) a vložena do 25 ml odběrového média (IMDM, 2% ATB). Následně byla za sterilních podmínek přenesena pinzetou na sterilní Petriho misky a nastříhána na kousky o velikosti přibližně 1 mm<sup>2</sup>. Kousky chrupavky byly vloženy do roztoku kolagenázy (0.9 mg/ml, collagenase NB 4G Proved Grade, SERVA) a inkubovány při teplotě 37°C a 5 % CO<sub>2</sub> po dobu 14 h. Po inkubaci byly rozvolněná tkáň s chondrocyty stočena po dobu 5 min při 300×g, následně byly chondrocyty resuspendovány v kultivačním médiu a nasazeny do kultivačních lahví. Buňky byly kultivovány v diferenciacním médiu IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) obsahujícím 10% FBS, 1% antibiotika

penicillin/streptomycin (100 µg/ml), L-glutamin (400 mM), dexamethazon (100 nM), A2P (50 µg/ml) a ITS-X (1%). Růstové médium obsahovalo IMDM obsahujícím 10% FBS, 1% antibiotika penicillin/streptomycin (100 µg/ml), L-glutamin (400 mM). Bylo nasazeno 300 000 buněk/25cm<sup>2</sup>. Buňky byly dále udržovány v inkubátoru při podmínkách 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> a vysoké vlhkosti.

## **2.5 KULTIVACE CHONDROCYTŮ**

Médium bylo měněno každé 3-4 dny. K pasáži buněk došlo až při dosažení asi 80% konfluence. Nejprve bylo odsáto médium a buňky opláchnuty fosfátovým pufrém (PBS). Následně byl přidán trypsin–EDTA a buňky inkubovány 2-3 min v inkubátoru. Trypsin je proteolytický enzym štěpící peptidické vazby bílkovin na karboxylovém konci aminokyselin lysinu a argininu, pokud za nimi nenásleduje prolin. Tím pomáhá uvolňovat buňky od podkladu, což jsme si ověřily pomocí světelné mikroskopie. K buňkám bylo přidáno médium s FBS, čímž došlo k zastavení činnosti trypsinu. Pro dosažení žádaného počtu buněk pro daný pokus, byly buňky při pasážování nasazeny v poměru 1:3 či 1:2.

## **2.6 NASAZENÍ CHONDROCYTŮ V MÉDIU**

Připravené sterilní nosiče byly vloženy do devadesáti šesti jamkové destičky. Nasazení chondrocytů do 96 jamkových destiček proběhlo opět po dosažení konfluence asi 80%. Buňky byly do destiček nasazeny ve 3. pasáži. Po centrifugaci byly buňky spočítány pomocí Bürkerovy komůrky a nasazeny do 96 jamkové destičky v počtu 25000 buněk na jamku. Tento počet buněk byl odměřen v 50 µl a destičky inkubovány při 5% atmosféře CO<sub>2</sub>, a teplotě 37°C, aby se usnadnila adheze buněk na nosič. Celkový objem byl doplněn na 250 µl na jamku a buňky byly opět vloženy do inkubátoru. Médium bylo měněno po 3 dnech. Ve většině pokusů bylo pracováno s experimentálním dnem 1, 3, 7, 10, 14 a 21. Médium přidávané ke studovaným skupinám nosičů je popsáno v tabulce u každého experimentu. Pozitivní kontrola PL u všech experimentů obsahovala diferenciační médium se všemi chondrogenními suplementy média. Toto médium je popsáno v kapitole 4.4 Izolace chondrocytů. Negativní skupina B obsahovala růstové médium bez přidáných suplementů (bez A2P, DEX, ITS-X). Byla pozorována kultivace primárních chondrocytů v růstovém a diferenciačním médiu a sledována exprese genu pro chondrogenní suplement agrekan (viz kapitola č. 3.2).

## 2.7 MTS TEST

MTS test (MTS Tetrazolium assay) slouží ke změření metabolické aktivity a viability buněk. MTS, či tetrazoliová sůl (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfo-phenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) je žlutý substrát, který je v mitochondriích redukován enzymem sukcinát dehydrogenázou na formazan, který má fialovou barvu. Nosiče byly přeloženy do nové devadesáti šesti jamkové destičky. Buňky se nechají inkubovat při 5% atmosféře CO<sub>2</sub>, a teplotě 37°C spolu s 20 µl tetrazoliové soli a 100 µl média po dobu 2 h. Následně je na spektrofotometru změřena absorbance pro objem 100 µl z každé jamky při 490 nm a referenční vlnové délce 690 nm. V experimentech byl pro MTS test použit experimentální den 1, 3, 7, 10, 14 a 21. Pomocí MTS testu změříme metabolickou aktivitu buněk související s činností jejich mitochondriálních enzymů. Nedokážeme však zjistit, jaké množství buněk se na nosiči nachází, nemůžeme tedy vědět, zda máme malý počet metabolicky aktivních buněk či velký počet méně metabolicky aktivních buněk. Proto spolu s MTS testem děláme test kvantifikace buněčné DNA, který určí obsah buněčné DNA na našich vzorcích. Z těchto dvou informací víme, jaký počet buněk máme na nanovlákněném nosiči a jak jsou metabolicky aktivní.

## 2.8 KVANTIFIKACE BUNĚČNÉ DNA

Picogreen je fluorescenční próba vázající se na dvouvláknovou DNA. Jedná se o 2-(n-bis-(3-dimethylaminopropyl)-amino)-4-(2,3-dihydro-3-methyl-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-methylidene)-1-phenyl-quinolinium). Při vytvoření komplexu s DNA se mnohonásobně zvýší fluorescence úměrně k množství DNA ve vzorku. Množství DNA bylo měřeno z 1., 3., 7., 10., 14. a 21. experimentálního dne. V tyto dny byly nosiče po MTS testu přeneseny pinzetou do zkumavky a bylo k nim přidáno 200 µl lyzačního roztoku (0.2% v/v Triton X-100, 10 mM Tris (pH 7.0), a 1 mM EDTA). Vzorky byly ponechány působení lyzačního roztoku 20 min za pokojové teploty. Následně byly zkumavky se vzorky zmrazeny v -80°C. Následně došlo ke 3 postupným zamražením následovaným rozmražením a zvortexováním. Pro měření byla použita černá 96 jamková luminiscenční destička. Na každou destičku byl použit duplet standartu pro 10 známých koncentrací DNA. Pipetováno bylo tedy buď 10 µl standartu nebo 20 µl vzorku a přidáno 200 µl roztoku Quant-iT™ dsDNA Assay Reagent. Tento roztok obsahuje onu fluorescenční sondu vázající se na DNA. Pro změření signálu byla použita excitační vlnová délka 485 nm a emisní vlnová délka 523 nm.



## **2.9 SKENOVACÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE**

Pro vizualizaci morfologie a adheze buněk pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM) byly buňky nejprve opláchnuty v PBS a fixovány v 2,5% glutaraldehydu v lednici po dobu 2 h. Následně došlo k postupnému vysušení pomocí etanolové řady (35, 48, 70, 96% etanol). V každé fázi došlo k inkubaci s buňkami za pokojové teploty po dobu 10 minut. Po dokončení etanolové řady byly buňky ponechány v absolutním etanolu po dobu 2x 10 min. Po odsátí etanolu byly v digestoři přidány 3 kapky HMDS, který se rychle odpařil. 96 jamková destička byla přechovávána v exsikátoru. Před pozorováním byly nosiče upevněny na kovový terčík a pokryty tenkou vrstvou zlata. Skenování proběhlo na skenovacím mikroskopu Vega 3 (Tescan). Vizualizace buněk byla zachycena z 1., 7., 14. a 21. experimentálního dne u experimentu č.1 a č.3.

## **2.10 KONFOKÁLNÍ MIKROSKOPIE**

Pro vizualizaci adheze buněk a syntézy kolagenu typu II byly použity techniky konfokální mikroskopie.

### **2.10.1 Adheze buněk - DiOC6 a propidium jodid**

Pro vizualizaci adheze byl použit DiOC6(3), který v buňkách barví membránové struktury. Vzorky byly nejprve propláchnuty PBS a zafixovány v mraženém metanolu (–20°C). Vzorky byly uloženy při –20°C do dne vizualizace. Po odsátí metanolu a 3x propláchnutí PBS se k buňkám přidalo 100µl DiOC6 (1µg/ml v PBS a pH 7,4) a nechalo inkubovat 45 minut za tmy, při pokojové teplotě. Vzorky byly poté promyty PBS. Pro vizualizaci buněčných jader byl použit propidium jodid, který se váže na DNA buněk. Bylo přidáno 100µl propidium jodidu na 10 minut při pokojové teplotě (5 µg/ml v PBS; pH 7.4). Vzorky byly 3x propláchnuty v PBS a pozorovány na konfokálním mikroskopu Zeiss LSM 5 DUO. Buňky byly vyfoceny 1., 7., 14. a 21. experimentálního dne. Hodnoty vlnových délek byly u DiOC6 (excitace 488, emise 520) a propidium jodid (excitace 560, emise 580).

### **2.10.2 detekce kolagenu II - Alexa fluor 488 a propidium jodid**

Pro pozorování syntézy kolagenu II chondrocyty, byla použita primární protilátka proti kolagenu II. Buňky byly nejprve zafixovány v methylalkoholu stejným způsobem jako při pozorování adheze buněk pomocí DiOC6 (viz výše). Po vyjmutí z mrazáku byly propláchnuty

v PBS a bylo k nim přidáno 100 µl roztoku 3% FBS a 0,1% Tritonu-X-100 v PBS. Po inkubaci 30 minut a propláchnutí v PBS se ke vzorkům přidala primární protilátka proti kolagenu II (1:20 a 50 ul/96 jamku). Vzorky se nechaly inkubovat s primární protilátkou 1 h při pokojové teplotě a následně byly propláchnuty roztokem 0,05% Tween 20 v PBS na 5, 10 a 15 minut. Před přidáním sekundární protilátky byly vzorky opláchnuty ještě v čistém PBS. Sekundární protilátku Alexa Fluor 488 anti mouse (1:300 a 70ul / 96 jamku) bylo nutno chránit před světlem a inkubovala se se vzorky po dobu 45 minut. Vzorky byly opět propláchnuty roztokem 0,05% Tween 20 v PBS na 5, 10 a 15 minut. Na závěr byly vzorky ještě propláchnuty v PBS. Na barvení jader byl opět použit propidium jodid stejným způsobem, jako v předešlé kapitole. Vzorky byly propláchnuty 3x PBS a pozorovány na konfokálním mikroskopu (Zeiss, LSM 5 DUO). Jako kontroly byly použity vzorky obarvené stejným způsobem, ovšem s vynecháním primární nebo sekundární protilátky pro vyloučení nespecifické vazby protilátky.

## **2.11 IZOLACE RNA**

Ve dnech 14 (experimenty č.1-č.6) a 21 (experimenty č. 5 a č.6) byla z nanovlákných nosičů vyizolována RNA s použitím protokolu izolačního RNA kitu (RNeasy Mini kit, Qiagen). Vzorky bylo nejprve potřeba lyzovat a oddělit buňky od nanovlákných nosičů. K nosičům s buňkami bylo přidáno 350 µl RLT pufru. Vzorky byly důkladně promíchány s pufrem pomocí homogenizátoru v přiloženém kitu. Posléze byly stočeny při 12000 rpm po dobu 5 minut (centrifuga Spectrafuge 24D, Labnet). Supernatant byl přepipetován do nové zkumavky. K precipitaci RNA došlo po přidání 350 µl 70% ethanolu skladovaného v mrazáku (-20°C). Vzorky se jemně promíchaly s pufrem a byly přepipetovány do speciální zkumavky se silikagelovou membránou. Centrifugovalo se 1 min při zrychlení 10000 rpm a sběrná zkumavka byla vylita. RNA byla vázána na membránu ze silikagelu. Postupným promýváním sadami pufrů z kitu došlo k oddělení RNA od ostatních organel a struktur v buňkách. Po přidání 700 µl pufru RW1 a stočení 1 min při zrychlení 10000 rpm se do sběrné zkumavky oddělily všechny molekuly, které se specificky nenavázaly na silikagelovou membránu. Roztok ve sběrné zkumavce byl vylit, po přidání 500 µl pufru RPE a centrifugaci 1 min při zrychlení 10000 rpm se ze vzorku odmyly zbytky přítomných soli. Sběrná zkumavka byla opět vylita a 500 µl pufru RPE bylo přidáno znovu. Nyní se však centrifugovalo 2 min při zrychlení 10000 rpm. Sběrná zkumavka byla vylita a vzorky ještě nasucho centrifugovány 3 min při zrychlení 12000 rpm. V posledním kroku byla

sběrná zkumavka nahrazena obyčejnou, bylo přidáno 30  $\mu$ l RNA free vody a vzorky stočeny 1 min při zrychlení 10000 rpm. Po posledním promytí vodou se izolovaná RNA odmyla z membrány a nacházela se v objemu 30  $\mu$ l v nové zkumavce. Ta byla zamrazena při  $-80^{\circ}\text{C}$  pro další použití, především pro kvantifikaci RNA a její využití v RT-PCR analýze.

## **2.12 KVANTIFIKACE RNA**

Zamražená RNA vzorků byla v průběhu experimentu rozmrazena z důvodu změření koncentrace RNA ve vzorcích. K tomu byl použit kit pro kvantifikaci buněčné RNA (Quant-iT™ RNA Assay Kit, Invitrogen). Z jednotlivých vzorků byl napipetován objem 10  $\mu$ l stejně jako objem standartů v kitu a doplněn na objem 200  $\mu$ l pracovním roztokem obsahující fluorescenční sondu interagující s RNA. Pro toto měření byly použity černé 96 jamkové fluorescenční destičky a reader BioTek. Měření proběhlo při hodnotách excitace 644 nm a emise 673 nm. Pro ověření hodnot byl pro měření koncentrace RNA použit rovněž přístroj NanoDrop, u níž se měřila absorbance vzorku při vlnové délce 260 nm a referenční vlnové délce 280 nm. Do speciálních optických jamek se napipetovala kapka vzorku (objem 1  $\mu$ l) a po změření hodnot z readru jsme získali hodnotu množství RNA udanou v nanogramech.

## **2.13 RT-PCR ANALÝZA**

Pro zjištění exprese RNA byla použita metoda RT-PCR. Po rozmrazení izolované RNA a změření její koncentrace byl ze vzorků odměřen objem obsahující stejné množství RNA pro všechny skupiny. Z RNA byla dále syntetizována cDNA s použitím protokolu z kitu pro syntézu cDNA (RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Scientific). Po celou dobu práce bylo zapotřebí udržovat vzorky na ledu. Reverzní transkripce, tedy přepis mRNA do cDNA využívá enzym reverzní transkriptázu. Syntetizovaná cDNA byla dále použita v RT-PCR analýze. Zde dojde nejprve k denaturaci za působení vyšší teploty ( $95^{\circ}\text{C}$ ). V experimentech byly zkoumány geny pro chondrogenní markery kolagen II a agrekan a dále kolagen I. Po snížení teploty je denaturovaná cDNA využita jako templát a na sekvence těchto genů nasedají přidané primery. Na ně posléze nasedá za působení vhodné teploty DNA polymeráza a jejím působením dojde k syntéze komplementárního řetězce. Celý postup se opakuje v cyklech, metodou RT-PCR dochází k exponenciální amplifikaci mRNA, která může být dále lépe detekována. K tomu jsou použity konkrétní sondy (viz. kapitola Přístroje) pro geny našeho zájmu. S jejich sekvencí přidané sondy hybridizují. Obsahují na 5' konci fluorescenční značku, která je činností polymerázy rozštěpena (díky její 5'-nukleázové

aktivitě) a vydává fluorescenční signál. Čím vyšší je signál, tím více sond je rozštěpeno, z čehož můžeme usuzovat na vyšší expresi daného genu. Pro jeho kvantifikaci je nutné použít referenční geny, ke kterým budou naměřené hodnoty vztaženy. V experimentech byl jako referenční gen použit GAPDH prasečího původu. Pro sledované geny a geny referenční byla na cycleru (Light Cycler 480, Roche) změřena hodnota  $C_p$  (aj. crossing point), která udává číslo cyklu, ve kterém hodnoty fluorescence přesáhnou prahovou hodnotu. Od hodnoty  $C_p$  sledovaného genu je odečtena hodnota  $C_p$  genu referenčního. Tato hodnota je nazvána  $\Delta C_p$ . Vzorcem  $2^{-\Delta C_p}$  je poté vypočítaná hodnota, která je vnesena do grafu. Z něj můžeme porovnat skupiny a vyčíst míru exprese sledovaných genů u skupin.

## 2.14 STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ

U metod MTS, Picogreen a RT-PCR bylo provedeno statistické vyhodnocení. Pro výpočet byly použity minimálně 4 vzorky na skupinu u metod MTS a PG, u metody RT-PCR byly použity minimálně 3. U agrekanu byly na RT-PCR k dispozici pouze 2 vzorky, statistické vyhodnocení nemohlo být provedeno. Naměřená data splňují předpoklady pro použití metody ANOVA (normalita dat a homogenita rozptylu). Jako vzorek je míněn vzorek nosiče (u všech vzorků byly použity primární chondrocyty z 1 prasete). Vyhodnocení vzorků statisticky proběhlo pomocí programu SigmaStat parametrickým testem One Way Analysis of Variance (ANOVA) a konkrétně Student-Newman-Keulsovy metody. Pokud test ANOVA nalezne statisticky významné rozdíly v rámci skupin, Student-Newman-Keulsova metoda může dále určit, mezi kterými konkrétními skupinami se nacházejí. V případě, že Student-Newman-Keulsova metoda nenalezla tyto konkrétní statisticky signifikantní rozdíly i přesto, že test ANOVA našel statisticky významné rozdíly obecně, byla zvolena Dunnova nebo Tukeyho metoda (Herve et al 2010). Hodnota signifikance byla zaznamenána do grafů jako číslo nad sloupcem skupiny, které udává, vůči které skupině je tato hodnota signifikantně vyšší. Hodnota signifikance  $p < 0,001$  byla zaznamenána do grafu jako číslo s hvězdičkou, hodnota signifikance  $p < 0,05$  byla zaznamenána pouze číslem.

### 3. VÝSLEDKY EXPERIMENTŮ

Cílem mé práce bylo sledování vlivu 2 látek – askorbátu-2-fosfátu a dexamethazonu na primárními chondrocyty osazené na PCL nosičích. Pozorována byla adheze, proliferace a diferenciaci chondrocytů. Kyselina askorbová (vitamin C) je důležitým substrátem v metabolismu chrupavčité tkáně, neboť se účastní hydroxylace aminokyselin prolin a lysin ve vznikajícím kolagenu. Pro testování byla zvolena sůl od ní odvozená, kterou je A2P. Jedná se o její redukovanou variantu ve formě koenzymu, která je stabilnější. Dexamethazon byl vybrán jako glukokortikoid podporující transkripci chondrogenních faktorů. Předpokládala jsem, že se zvyšující koncentrace askorbátu-2-fosfátu by měla podporovat diferenciaci do chondrogenní morfologie z důvodu dostatečného množství substrátu podporujícího tvorbu kolagenu II. U skupin s dexamethazonem jsme z literatury zjistili, že vyšší koncentrace této látky může být pro buňky toxická, a proto jsme předpokládali lepší diferenciaci do chondrogenní linie a proliferaci spíše u skupin s nižší koncentrací dexamethazonu.

Chondrocyty byly po odebrání z dospělých prasečích jedinců po porážce izolovány a kultivovány v kultivačních lahvích v chondrogenním diferenciačním médiu. Pro testování jsme použili PCL nanovláknennou síť vytvořenou metodou centrifugačního zvláknování. Tato metoda byla upřednostněna před klasickou metodou elektrostatického zvláknování vzhledem k možnosti vytvářet 3D nanovláknenná prostředí PCL byl vybrán pro své biokompatibilní a biodegradabilní vlastnosti. Jedná se tedy o materiál vhodný pro buněčnou adhezi a proliferaci. A2P nebo DEX byly k buňkám přidávány namíchané v médiu, nebo u některých pokusů přímo zvlákněny do jádra nanovláken. Tyto core-shell neboli jádroplášťová nanovláknna nabízejí potenciál uvolňování látky ze svého jádra postupně a tím tedy dochází k prodloužení jejich působení v čase. Adheze a proliferace buněk byly pozorovány pomocí konfokální mikroskopie a SEM. Metabolická aktivita pomocí MTS testu, kvantifikace DNA pomocí DNA kvantifikace a diferenciaci metodou RT-PCR. Tabulka č. 3 popisuje označení a charakterizaci skupin pro experimentální část práce.

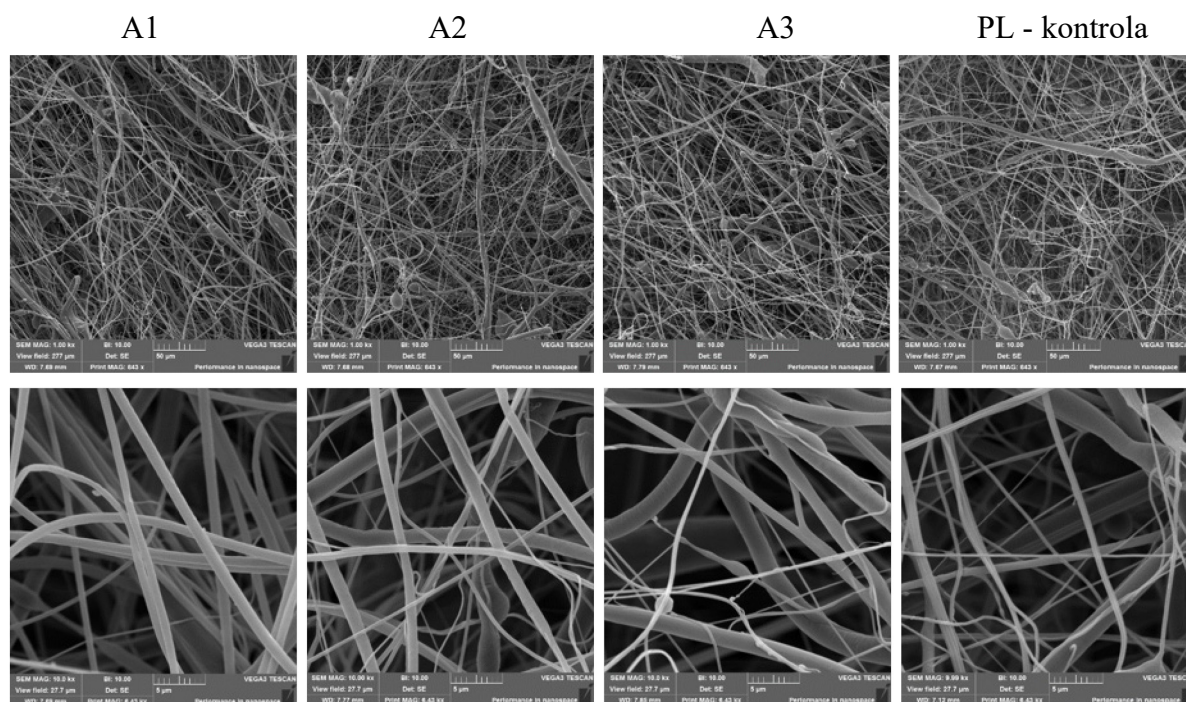
**Tabulka č. 3:** Popis experimentů se studovanými suplementy A2P a DEX

Číslo exp.	Typ studované molekuly	Kde se molekula nachází	Počet skupin
Experiment č.1	A2P	Volně přidán do média, bez dalších chondrogenních molekul (bez DEX a ITS-X)	4
Experiment č.2	A2P	Volně přidán do média, s dalšími molekulami (DEX, ITS-X)	5
Experiment č.3	DEX	Volně přidán do média, bez dalších chondrogenních molekul (bez A2P a ITS-X)	3
Experiment č.4	DEX	Volně přidán do média, s dalšími molekulami (A2P, ITS-X)	4
Experiment č.5	A2P	Zvlákněné v PCL nanovlákněch, A2P spolu s dalšími molekulami (DEX, ITS-X)	4
Experiment č.6	DEX	Zvlákněné v PCL nanovlákněch, DEX spolu s dalšími molekulami (A2P, ITS-X)	3

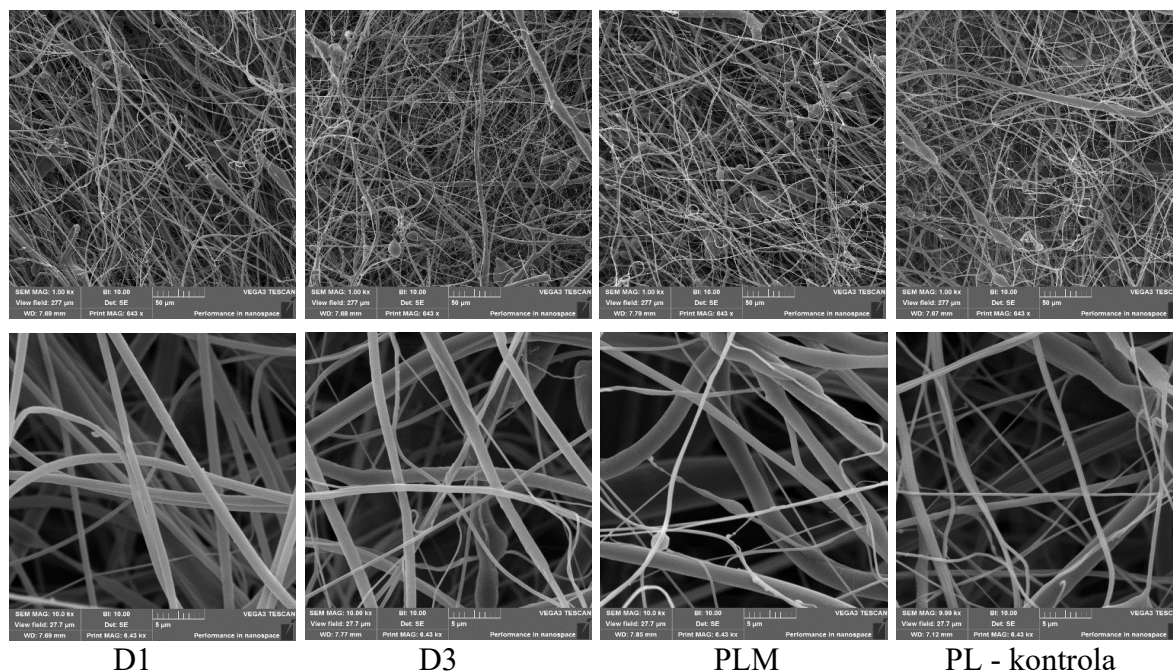
### 3.1 CHARAKTERIZACE PCL NANOVLÁKEN

PCL nosiče z experimentu č.5 a č.6 byly po zvláknění analyzovány na skenovacím elektronovém mikroskopu. V obrázku č. 16 vidíme morfologii vláken u jednotlivých nosičů. Skupiny A1, A2, A3, A4, D1, D3, PLM představují nosiče, u nichž byly molekuly A2P, DEX a ITS-X zvlákněny do jádra nanovláknat při procesu centrifugačního zvláknování. Skupiny nosičů A1-A4 se liší koncentrací zvlákněného A2P, skupiny D1 a D3 koncentrací zvlákněného DEX. Skupina A2 odpovídá koncentračně skupině D2. Skupina PL označuje PCL nosič bez zvlákněných složek, v experimentu byl vybrán jako pozitivní kontrola s přidáním diferenciačním médiem. Na obrázku č. 16 a č. 17 vidíme podobné uspořádání a velikost vláken u jednotlivých skupin.





**Obr. č. 16: PCL nosiče připravené centrifugáním zvlákněním:** SEM charakterizace nosičů zobrazující přibližnou porozitu a průměr nanovláken. Skupiny z experimentu č. 5.: zleva A1, A2, A3, u nichž A2P inkorporován do nanovláken při zvláknění ve čtyřech různých koncentracích (A1 - 25 µl/ml, A2 - 50 µl/ml, A3 - 100 µl/ml). Spolu s askorbátem byly ve skupinách A1-A3 zvlákněny i látky DEX a ITS-X ve stejných koncentracích jako se nacházejí v diferenciačním médiu (DEX - 100 nM, ITS-X - 1%). Zvětšení 1000x první řádek a 10000x druhý řádek.



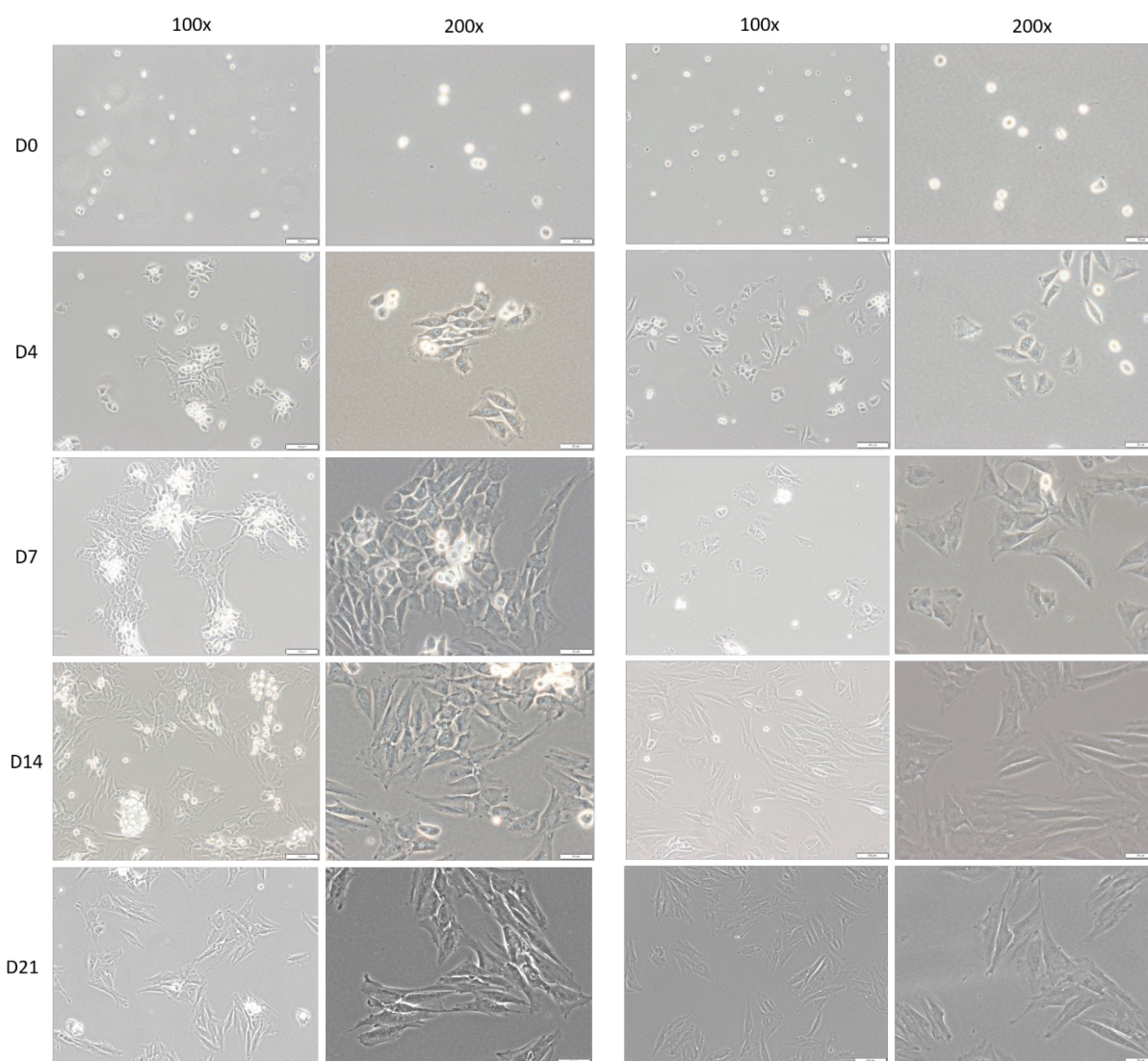
**Obr. č. 17 - PCL nosiče připravené centrifugáním zvlákněním:** SEM charakterizace nosičů zobrazující přibližnou porozitu a průměr nanovláken. Skupiny z experimentu č.6.: Zleva skupiny D1, D3, PLM, PL. Skupiny D1, D2 a D3 z experimentu č. 6, u nichž byl zvlákněn DEX ve 3 různých koncentracích (D1 - 10nM, D2 - 100 nM, D3 – 1000 nM). Skupina D2 odpovídá koncentračně skupině A2 z pokusu č. 5 a je znázorněna v obr.č.2 s označením A2. Skupina PLM obsahuje dvojnásobné množství koncentrací látek, než chondrogení



diferenciační médium (A2P - 100  $\mu$ l/ml, DEX - 200 nM, ITS-X - 2%). Kontrola PL obsahuje samotná PCL vlákna bez dalších zvlákněných látek. Zvětšení 1000x první řádek a 10000x druhý řádek.

### 3.2 POZOROVÁNÍ KULTIVACE V RŮSTOVÉM A DIFERENCIAČNÍM MÉDIU

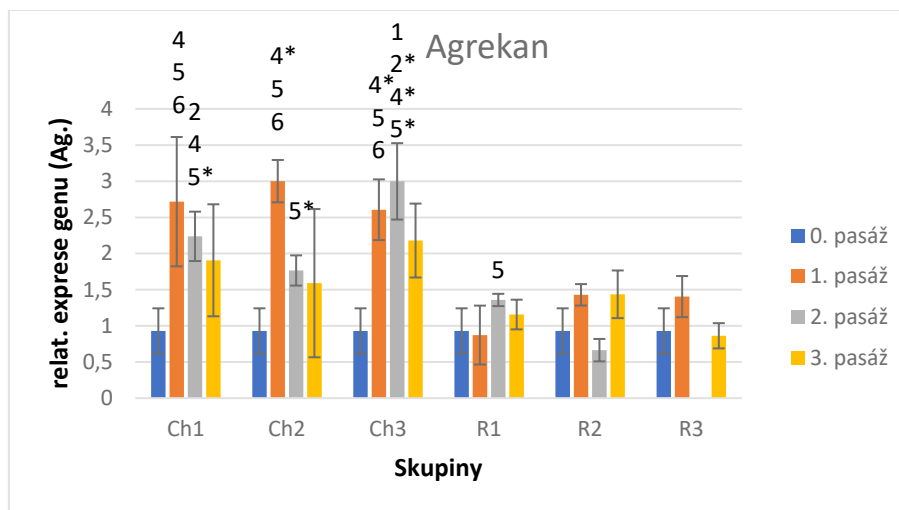
Za účelem studia dediferenciace na kultivačním plastu byly primární prasečí chondrocyty z dospělého prasečího jedince po porážce dále kultivovány v růstovém médiu (bez chondrogenních suplementů) a v diferenciačním médiu obsahujícím chondrogenní suplementy A2P, DEX a ITS-X (viz obr. č. 19). Pasáž byla dělána po 7 dnech, celkově byly provedeny 3 pasáže v 21 dnech. Buňky byly kultivovány vždy do přibližně 80% konfluence, poté byly trypsinem uvolněny a nasazeny do nové kultivační lahve (koncentrace 12 tis/cm<sup>2</sup>).



**Obr. č. 18 – Kultivace primárních chondrocytů v diferenciačním médiu** - dokumentována světelným mikroskopem, zvětšení 100x a 200x, velikost měřky 100  $\mu$ m (100x) a 50  $\mu$ m (200x)

**Obr. č. 19 – Kultivace primárních chondrocytů v růstovém (B) médiu** - dokumentována světelným mikroskopem, zvětšení 100x a 200x, velikost měřky 100  $\mu$ m (100x) a 50  $\mu$ m (200x)





**Graf č. 1 - Množství mRNA pro agrekan syntetizovaná chondrocyty kultivovanými v diferenciačním (kultivační lahve Ch1, Ch2, Ch3) a růstovém médiu (kultivační lahve R1, R2, R3).**

Pomocí RT-PCR analýzy byla zjištěna exprese genu pro agrekan, jeden z chondrogenních markerů. V 1. pasáži došlo k nárůstu exprese agrekanu u buněk kultivovaných v diferenciačním médiu (Ch1-Ch3). V 2. a 3. pasáži došlo naopak k poklesu agrekanu u těchto buněk (viz graf č. 1). V růstovém médiu (R1-3) byl trend u exprese agrekanu snižovaný, během 3. pasáží nebyl pozorován nárůst.

### 3.3 VLIV CHONDROGENNÍCH MOLEKUL VOLNĚ PŘIDANÝCH DO MÉDIA

#### 3.3.1 Experiment č. 1 - Vliv askorbátu-2-fosfátu bez přidaných chondrogenních suplementů na adhezi, proliferaci a diferenciaci chondrocytů

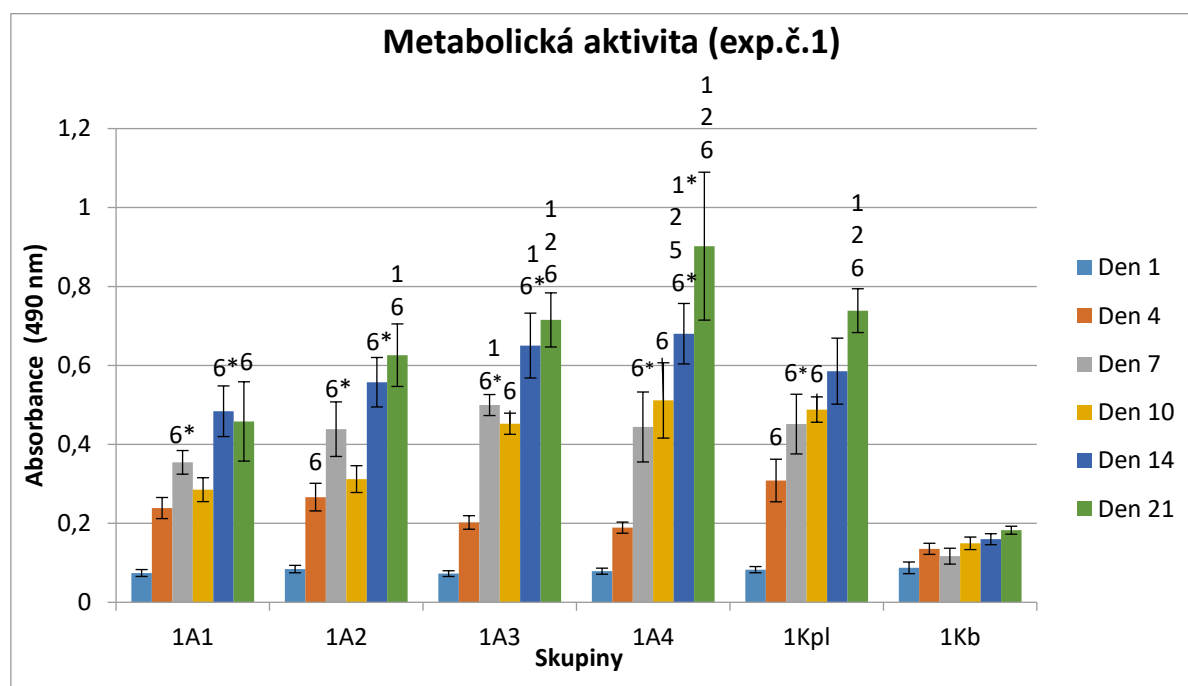
Nejprve byl testován vliv A2P, který byl k buňkám přidán volně do média IMDM s 10% FBS a 1% ATB na buněčnou adhezi, proliferaci, metabolickou aktivitu, viabilitu a diferenciaci. Testování proběhlo ve 2 nezávislých pokusech. V prvním pokusu byl zkoumán vliv 4 různých koncentrací (sk. 1A1-1A4) samotného A2P bez přidaných chondrogenních suplementů (DEX, ITS-X) do IMDM média. Buňky byly na nosiči kultivovány po dobu 21 dní. Pro oba pokusy byly vytvořeny stejné 2 kontrolní skupiny. Pozitivní kontrola (1Kpl), obsahovala vzorky s diferenciačním IMDM chondrogenním médiem. Toto médium je běžně používáno pro kultivaci chondrocytů v lahvích i pro kultivaci chondrocytů na nosičích během experimentů. Negativní kontrola (1Kb), obsahovala PCL vzorky s IMDM médiem bez chondrogenních faktorů (viz tab. č. 4). Předpokládáme, že na skupině B, jakožto negativní kontrole budou buňky diferencovat nejméně, protože neobsahuje A2P, DEX ani ITS-X. Nemá tedy chondrogenní molekuly hrající roli při tvorbě chrupavčité tkáně.

**Tabulka č. 4:** Označení skupin a koncentrací médií v pokusu č. 1

Skupina	Médium	Nosič
1A1	IMDM, FBS 10%, ATB 1%, L-glutamin (800 mM), A2P (25 µg/ml)	PCL
1A2	IMDM, FBS 10%, ATB 1%, L-glutamin (800 mM), A2P (50 µg/ml)	PCL
1A3	IMDM, FBS 10%, ATB 1%, L-glutamin (800 mM), A2P (100 µg/ml)	PCL
1A4	IMDM, FBS 10%, ATB 1%, L-glutamin (800 mM), A2P (200 µg/ml)	PCL
1Kpl (kontrola - pozitivní)	IMDM, FBS 10%, ATB 1%, L-glutamin (800 mM), A2P (50 µg/ml), Dexamethazon (100nM), ITS-X 1%	PCL
1Kb (kontrola - negativní)	IMDM, FBS 10%, ATB 1%, L-glutamin (800 mM)	PCL

### 3.3.1.1 MTS test

Skupiny Metabolická aktivita a viabilita buněk byla změřena MTS testem 1., 3., 7., 10., 14. a 21. den. Aktivitu mitochondriálních enzymů odpovídající metabolické aktivitě buněk vidíme znázorněnou v grafu č. 2.



**Graf č. 2: Metabolická aktivita buněk v experimentu č. 1:** A2P volně přidán do média ve 4 koncentracích (skupiny 1A1-1A4). Skupina 1Kpl – pozitivní kontrola (přidáno diferenciační médium). Skupina 1Kb – negativní kontrola (přidáno růstové médium). Naměřené hodnoty absorbance ve dnech 1, 3, 7, 10, 14 a 21 MTS testem jsou vyneseny v grafu. Statisticky významné rozdíly mezi skupinami jsou značeny číslem nad sloupci (1A1=1, 1A2=2, 1A3=3, 1A4=4, 1Kpl=5 a 1Kb=6),  $p < 0,05$  a \* $p < 0,001$ .

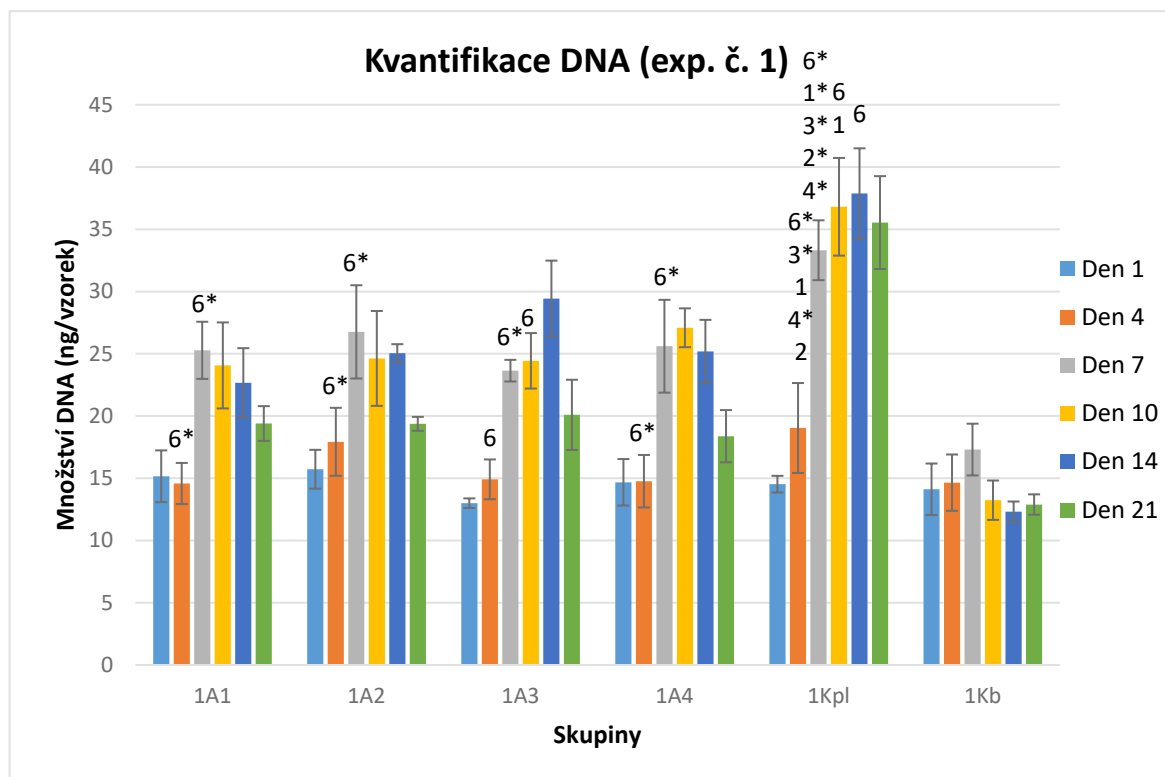
Můžeme vidět, že v den 1 proběhla pravděpodobně buněčná adheze na nanovláknenný nosič, neboť zde buňky již vykazují nízkou metabolickou aktivitu. Tuto skutečnost si musíme

dále ověřit kvantifikací buněčné DNA a z konfokální mikroskopie a SEM. Nejvyšší hodnota absorpance v den 21 byla u skupiny 1A4  $0,90 \pm 0,19$  a nejnižší u negativní kontroly 1Kb  $0,18 \pm 0,01$ . Statisticky signifikantní rozdíl byl zaznamenán v den 4 u skupiny 1A2 a 1Kpl vůči skupině 1Kb. V den 7 byl statisticky významný rozdíl pozorován u všech skupin vůči skupině 1Kb, v den 10 pouze u skupin 1A3, 1A4 a 1Kpl vůči skupině 1Kb. V den 14 byl pozorován statisticky významný rozdíl vůči skupině 1Kb (u skupin 1A1-1A4 a 1Kpl), dále byl rozdíl u skupiny u 1A3 vůči 1A1 a u skupiny 1A4 vůči skupinám 1A1, 1A2 a 1 Kpl. Jinak byly rozdíly mezi skupinami statisticky nesignifikantní. Z grafu je patrné, že se vzrůstající koncentrací A2P v médiu vzrůstala i metabolická aktivita chondrocytů na nanovlákných nosičích, především v den 21. Skupiny měly podobný průběh metabolické aktivity, metabolická křivka měla vzestupný průběh. Hodnoty metabolické aktivity pozitivní kontroly 1Kpl v průběhu pokusu a především v den 21 nepřevyšovaly hodnoty metabolické aktivity ostatních skupin. Pozitivní kontrola 1Kpl obsahuje diferenciační médium se všemi chondrogenními suplementy a tudíž by na ní podle naší hypotézy měly buňky nejlépe diferencovat. Skupiny 1A1-1A4 obsahují různé koncentrace A2P, ale neobsahují další chondrogenní suplementy, kterými je DEX a ITS-X. Skupiny 1A3 a 1A4 obsahují zvýšenou koncentraci A2P, který jako samostatná složka v médiu nejspíš hraje roli při zvyšování metabolické aktivity buněk. Skupina 1A2 obsahuje stejnou koncentraci A2P jako diferenciační médium u skupiny 1Kpl a z dat je patrné, že hodnoty metabolické aktivity buněk si jsou u těchto dvou skupin podobné. Buňky skupiny 1Kb podle očekávání měly velice nízkou metabolickou aktivitu. To dokazuje důležitou roli A2P pro metabolickou aktivitu primárních chondrocytů.

### 3.3.1.2

### Kvantifikace buněčné DNA

Obsah DNA buněk chondrocytů byl kvantifikován, pro měření se použily stejné vzorky z měření MTS v den 1, 3, 7, 10, 14 a 21.



**Graf č. 3: Množství DNA v experimentu č. 1:** Hodnoty naměřeného množství DNA v ng/vzorek. A2P přidáný volně v médiu ve 4 koncentracích (skupiny 1A1-1A4). Skupina 1Kpl – pozitivní kontrola (přidáno diferenciační médium). Skupina 1Kb – negativní kontrola (přidáno růstové médium). Statisticky významné rozdíly mezi skupinami jsou značeny číslem nad sloupci (1A1=1, 1A2=2, 1A3=3, 1A4=4, 1Kpl=5 a 1Kb=6),  $p < 0,05$  a \* $p < 0,001$ .

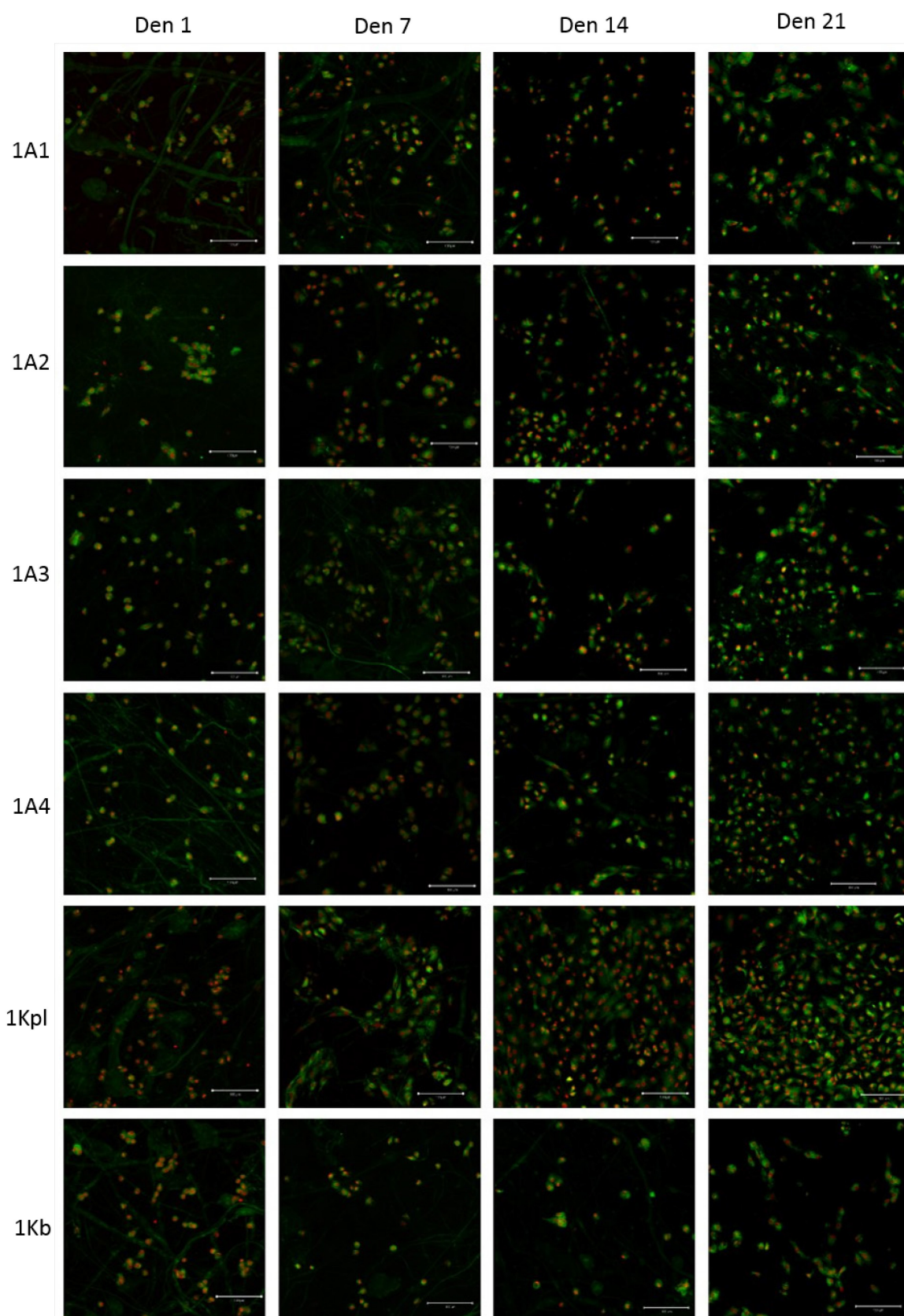
Naměřené hodnoty obsahu buněčné DNA potvrzují adhezi buněk na nosič v den 1. Na všechny nosiče adheroval přibližně stejný počet buněk. Na grafu č. 3 pozorujeme postupné navyšování obsahu DNA v průběhu 21 denního pokusu. U většiny skupin bylo dosaženo maxima v den 7 a nadále příliš nedocházelo k dalšímu buněčnému dělení. U skupin 1A1-1A4 došlo k úbytku buněčné DNA 21. den. To může být způsobeno dosažením konfluency na nosiči a nástupu odumírání buněk. Největší množství buněk bylo na nosiči skupiny 1Kpl s hodnotou  $37,87 \pm 3,63$  ng/vzorek. Statisticky významné rozdíly byly pozorované v den 4 mezi skupinami 1A1-1A4 vůči negativní kontrole 1Kb a mezi pozitivní kontrolou 1Kpl všem ostatním skupinám. To se u skupiny 1Kpl opakovalo i 7. den, kdy měly skupiny 1A1-1A4 rozdíl pouze vůči 1Kb. V den 10 byl pozorován rozdíl mezi skupinou 1A3 vůči 1Kb, dále u skupiny 1Kpl vůči 1A1 a 1Kb. V den 14 byl ještě rozdíl mezi 1Kpl a 1Kb.

### **3.3.1.3**

#### **Konfokální mikroskopie**

Adheze a proliferace chondrocytů byla pozorována pomocí konfokální mikroskopie.

Na obr. č. 20 vidíme, že v den 1 došlo k adhezi buněk na nanovláknový povrch ve všech skupinách. Největší množství buněk v den 21 obsahovala pozitivní kontrola 1Kpl, kde buňky již dosáhly konfluence, data jsou ve shodě s kvantifikací buněčné DNA (graf č. 3). Ze skupin, kde byl do média přidán A2P byl nejvíce porostlý buňkami nosič skupiny 1A4, kde byly kolonie buněk porostlé rovnoměrně po celém nosiči. U ostatních skupin v den 21 byly pozorovány lokální shluky a více prázdných míst.



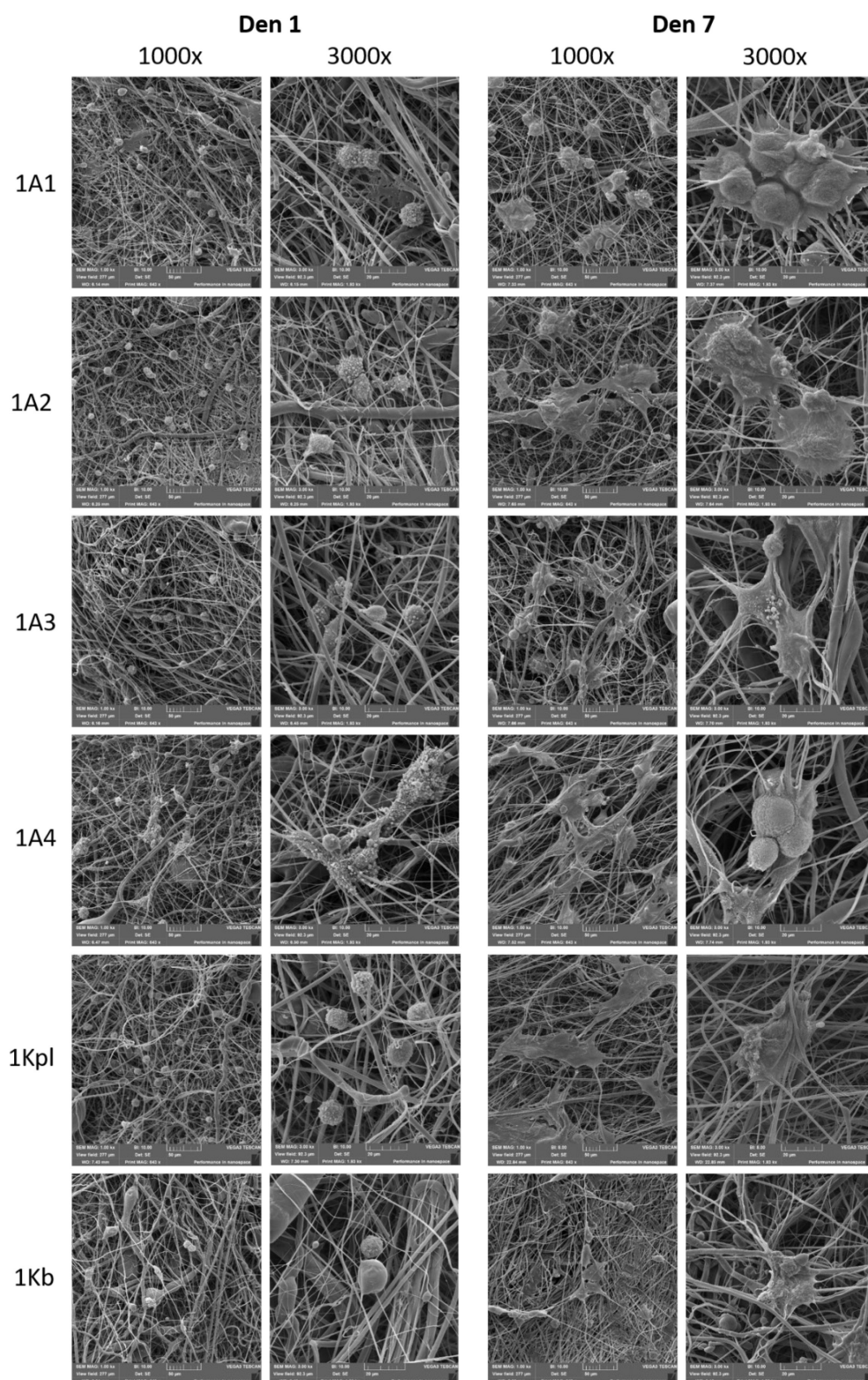
**Obr. č. 20 - Vizualizace adheze a proliferace buněk pomocí konfokální mikroskopie v experimentu č. 1.** Červeně obarvená jádra propidium jodidem a zeleně membránové struktury pomocí DiOC6(3). A2P přidáný volně v médiu ve 4 koncentracích (skupiny 1A1-1A4). Skupina 1Kpl – pozitivní kontrola (přidáno diferenciační médium). Skupina 1Kb – negativní kontrola (přidáno růstové médium). Měrka u všech obrázků 100 $\mu$ m, zvětšení 100x.



### 3.3.1.4

### Skenovací elektronová mikroskopie

Pomocí SEM byla pozorována morfologie buněk ve dnech 1,7,14 a 21 experimentu, na obr. č. 21 můžeme vidět morfologii v den 1 a 7.



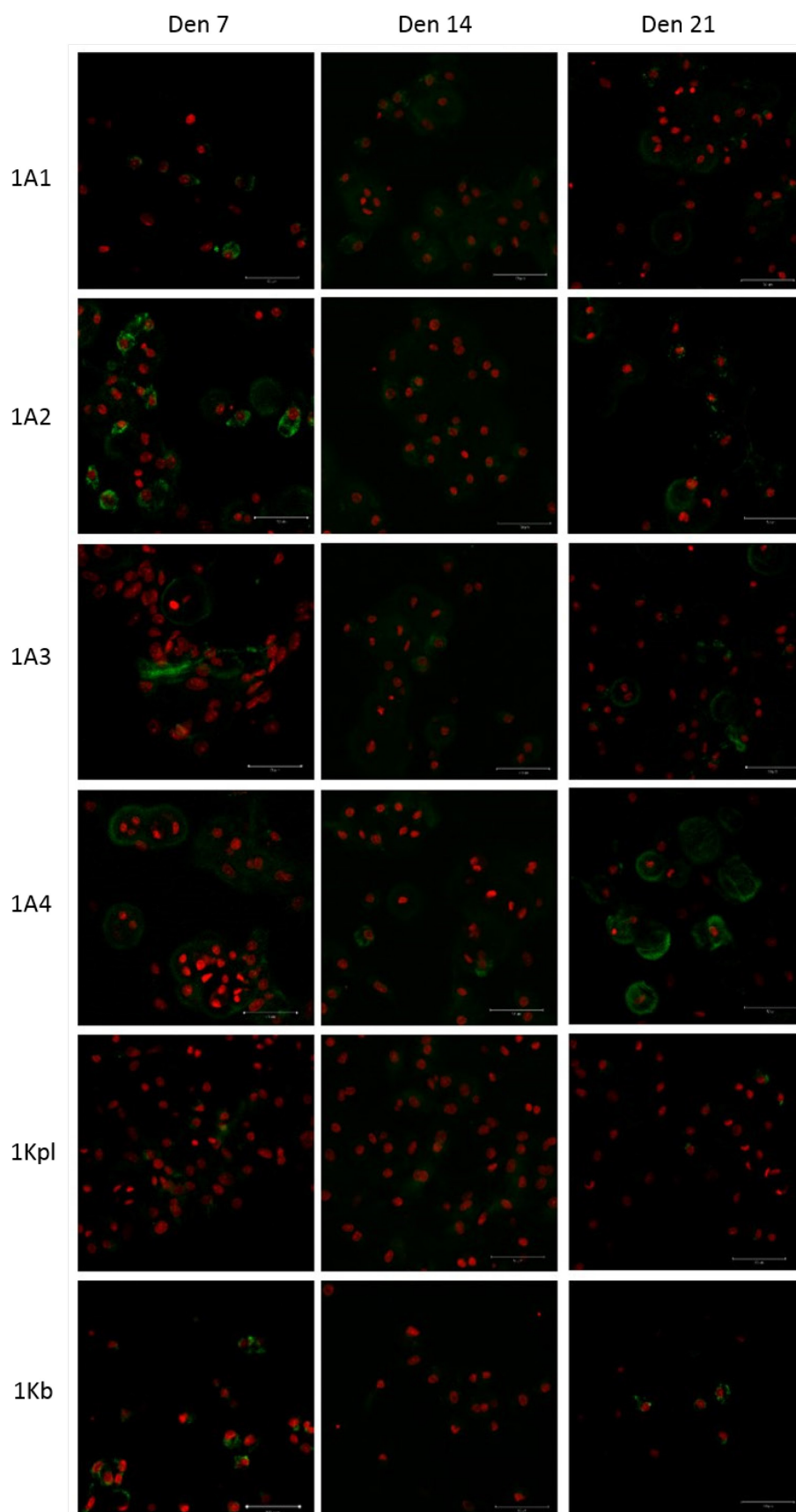
Obr. 21. Vizualizace buněk pomocí SEM. Měrka 50 µm (zvětšení 1000x) a 20 µm (zvětšení 3000x).

V den 1 buňky vykazovaly morfologii typickou pro chondrocyty, zakulacený tvar a velikost  $< 20$  mikrometrů, což je běžná velikost chondrocytů. Buňky byly nasazené rovnoměrně a ve stejném počtu, což je ve shodě s daty kvantifikace buněčné DNA ze dne 1. V den 7 začaly buňky vytvářet shluky, u skupiny 1Kpl docházelo ke zploštění tvaru buněk.

#### **3.3.1.5 Imunobarvení prokolagenu typu II**

Pro detekci prokolagenu typu II bylo použito imunofluorescenční barvení a konfokální mikroskopie (viz obr č. 22). Pomocí konfokální mikroskopie bylo pozorováno malé množství prokolagenu typu II v den 7, především u skupiny 1A1-1A3 (obrázek č. 22). V den 14 nebyl prokolagen typu II viditelný, v den 21 se vytvářel v menším množství, než v den 7, u skupin s A2P. U negativní kontroly se malé množství prokolagenu typu II vytvářelo, u pozitivní kontroly se příliš nevytvářel.



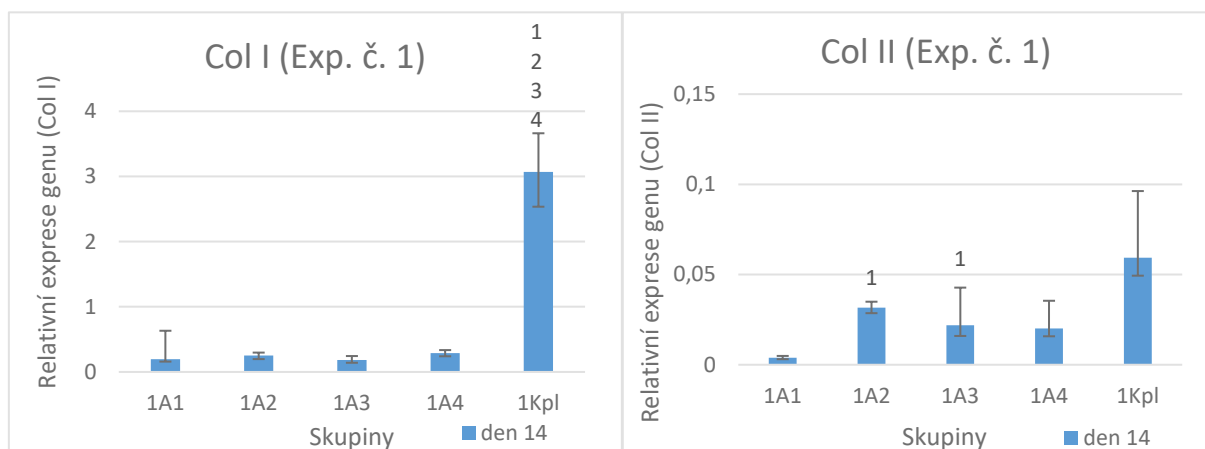


**Obr. č. 22 - Imunobarvení prokolagenu typu II v experimentu č. 1:** Prokolagen typu II detekován pomocí primární protilátky proti prokolagenu typu II a sekundární protilátky Alexa fluor 488. Na obrázcích je zobrazen zeleně. Jádra svítí červeně po barvení propidium jodidem. Skupiny 1A1-1A4 a kontroly 1Kpl a 1Kb pozorovány ve dnech 7, 14 a 21. Měrka u všech obrázků ve velikosti 50  $\mu\text{m}$ , zvětšení 200x.

### 3.3.1.6

### RT-PCR

Pomocí metody RT-PCR byla 14. den změřena exprese genů pro kolagen typu I,



kolagen typu II a agrekan (viz grafy č. 4, 5 a 6).

**Graf č. 4 – Relativní exprese genu pro kolagen I (exp. č. 1)**



**Graf č. 5 - Relativní exprese genu pro kolagen II (exp. č. 1)**

**Graf č. 6 - Relativní exprese genu pro agrekan (exp. č. 1)**

Pozn. ke grafům č. 4, 5, 6: Statisticky významné rozdíly mezi skupinami jsou značeny číslem nad sloupci (1A1=1, 1A2=2, 1A3=3, 1A4=4, 1Kpl=5),  $p < 0,05$  a  $*p < 0,001$ .

V pozitivní kontrole 1Kpl docházelo k expresi genu pro kolagen typu I, II i agrekan. Exprese genu pro kolagen typu I u skupiny 1Kpl byla vyšší oproti skupinám 1A1-1A4, se statisticky významným rozdílem. Gen pro kolagen typu I se u skupin 1A1-1A4 příliš neexprimoval. U exprese kolagenu II byl statisticky významný rozdíl mezi skupinami zaznamenán u skupin 1A2 a 1A3 vůči skupině 1A1. Hodnoty agrekanu byly změřeny z finančních důvodů pouze z dupletu vzorků, proto u něj nemohla být udělána statistika. Můžeme zde však pozorovat zvýšený trend u pozitivní kontroly 1Kpl.

### 3.3.2 Experiment č. 2 – L-askorbát-2-fosfát v médiu s dalšími chondrogenními suplementy (DEX, ITS-X)

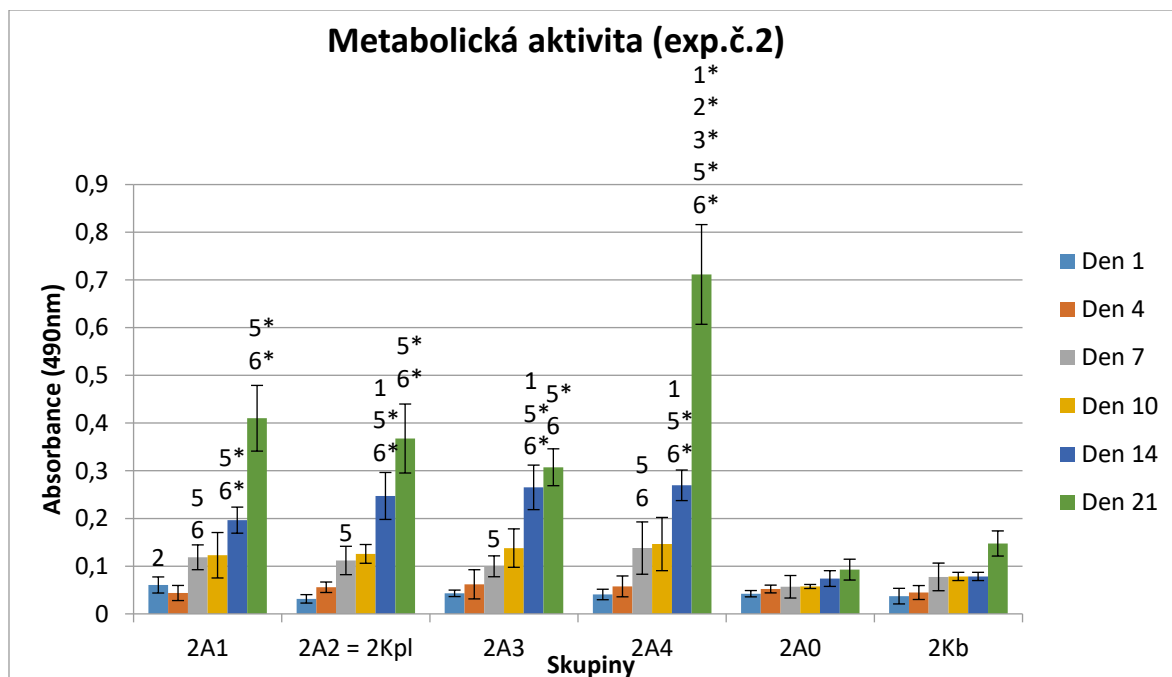
Ve druhém experimentu byl zkoumaný A2P opět přidáván k buňkám volně do média. Na rozdíl od prvního experimentu se zde tato látka nacházela v kontextu dalších chondrogenních molekul přítomných v diferenciačním chondrogenním médiu. Vytvořeno bylo 5 skupin (viz tab. č. 5). Skupiny 2A1-2A4 obsahují stejné koncentrace A2P jako skupiny 1A1-1A4 z experimentu č. 1, avšak jsou doplněny o DEX a ITS-X v koncentraci nacházející se v diferenciačním médiu. Skupina 2A0 neobsahuje A2P, avšak obsahuje DEX a ITS-X opět v koncentraci, v jaké se nacházejí v diferenciačním médiu. Skupina 2A2 odpovídá pozitivní kontrole 2Kpl a obsahuje diferenciační médium. Negativní kontrola 2Kb obsahuje růstové médium bez chondrogenních molekul. Buňky byly opět nasazeny na stejný PCL nanovlákněný nosič.

**Tabulka č. 5:** Označení skupin a koncentrací médií v pokusu č. 2

Skupina	Médium	Nosič
2A1	IMDM, FBS 10%, ATB 1%, L-glutamin (800 mM), A2P (25 µg/ml), Dexamethazon (100 nM), ITS-X 1%	PCL
2A2 = 2Kpl (kontrola - pozitivní)	IMDM, FBS 10%, ATB 1%, L-glutamin (800 mM), A2P (50 µg/ml), Dexamethazon (100 nM), ITS-X 1%	PCL
2A3	IMDM, FBS 10%, ATB 1%, L-glutamin (800 mM), A2P (100 µg/ml), Dexamethazon (100 nM), ITS-X 1%	PCL
2A4	IMDM, FBS 10%, ATB 1%, L-glutamin (800 mM), A2P (200 µg/ml), Dexamethazon (100 nM), ITS-X 1%	PCL
2A0	IMDM, FBS 10%, ATB 1%, L-glutamin (800 mM), Dexamethazon (100 nM), ITS-X 1%	PCL
2Kb (kontrola - negativní)	IMDM, FBS 10%, ATB 1%, L-glutamin (800 mM)	PCL

#### 3.3.2.1 MTS test

Metabolická aktivita buněk byla změřena MTS testem a vynesena do grafu č. 7.



**Graf č. 7: Metabolická aktivita buněk v experimentu č. 2:** A2P volně přidán v médiu ve 4 koncentracích (skupiny 2A1-2A4) spolu s dalšími chondrogenními suplementy (DEX, ITS-X). Skupina 2A2 odpovídá 2Kpl – pozitivní kontrola (přidáno diferenciační médium). Skupina 2Kb – negativní kontrola (přidáno růstové médium). Naměřené hodnoty absorbance ve dnech 1, 3, 7, 10, 14 a 21 MTS testem jsou vyneseny v grafu. Statisticky významné rozdíly mezi skupinami jsou značeny číslem nad sloupce (2A1=1, 2A2(2Kpl)=2, 2A3=3, 2A4=4, 2A0=5 a 2Kb=6),  $p < 0,05$  a \* $p < 0,001$ .

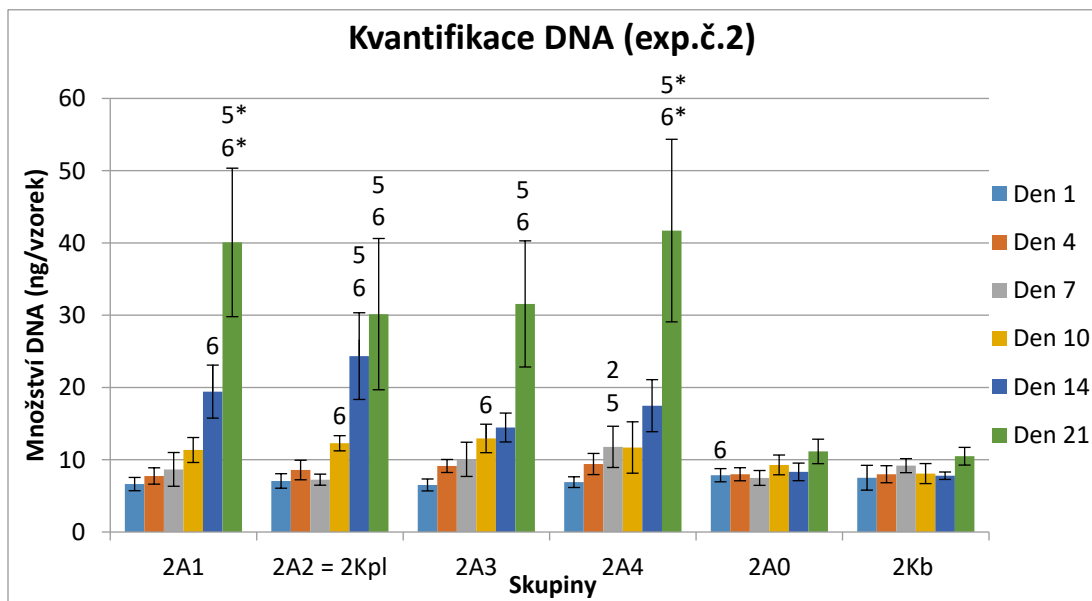
V den 1 byla u všech skupin zaznamenána nízká metabolická aktivita. Je patrný postupný nárůst metabolické aktivity až do dne 21 u všech skupin, kde skupiny dosáhly maximálních hodnot metabolické aktivity. Nejvyšší hodnoty v den 21 dosáhla skupina 2A4 s hodnotou absorbance  $0,71 \pm 0,10$ . Skupina 2A0 se blížila metabolickou aktivitou negativní kontrole 2Kb. Chondrocyty u skupiny 2A0 a 2Kb, kdy se v médiu vyskytovaly pouze suplementy DEX a ITS-X bez A2P, měly v průběhu experimentu velmi nízkou metabolickou aktivitu nepříliš vyšší ode dne 1. Skupiny 2A1-2A4 obsahující A2P byly zvlášť v den 21 velmi metabolicky aktivní. Se zvyšující se koncentrací A2P se zvyšovala i metabolická aktivita, metabolická křivka měla vzestupný trend. Nejvíce metabolicky aktivní byla skupina 2A4. Pozitivní kontrola 2Kpl odpovídá skupině 2A2.

Statisticky významné rozdíly byly zaznamenány již v den 1 u skupiny 2A1 vůči 2A2. V den 7 byly rozdíly patrné u skupin 2A2 a 2A3 vůči 2A0 a dále u skupin 2A1 a 2A4 vůči skupinám 2A0 a 2Kb. V den 14 experimentu byly pozorovány rozdíly u skupin 2A2-2A3 vůči skupinám 2A1, 2A0 a 2Kb, u skupiny 2A1 pouze vůči skupinám 2A0 a 2Kb. V den 21 se statistické rozdíly projeví mezi a skupinami 2A1-2A3 vůči skupinám 2A0 a 2Kb. V den 21 byl také zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi skupinou 2A4 vůči všem ostatním skupinám.

### 3.3.2.2

### Kvantifikace buněčné DNA

Kvantifikace obsahu DNA buněk byla měřena pomocí Picogreen testu (graf č. 8).



**Graf č. 8: Množství DNA v experimentu č. 2:** Hodnoty naměřeného množství DNA v ng/vzorek. A2P přidáný volně v médiu ve 4 koncentracích (skupiny 2A1-2A4) spolu s dalšími chondrogenními suplementy (DEX, ITS-X). Skupina 2Kpl – pozitivní kontrola (přidáno diferenciální médium). Skupina 2Kb – negativní kontrola (přidáno růstové médium). Statisticky významné rozdíly mezi skupinami jsou značeny číslem nad sloupci (2A1=1, 2A2(2Kpl)=2, 2A3=3, 2A4=4, 2A0=5 a 2Kb=6),  $p < 0,05$  a \* $p < 0,001$ .

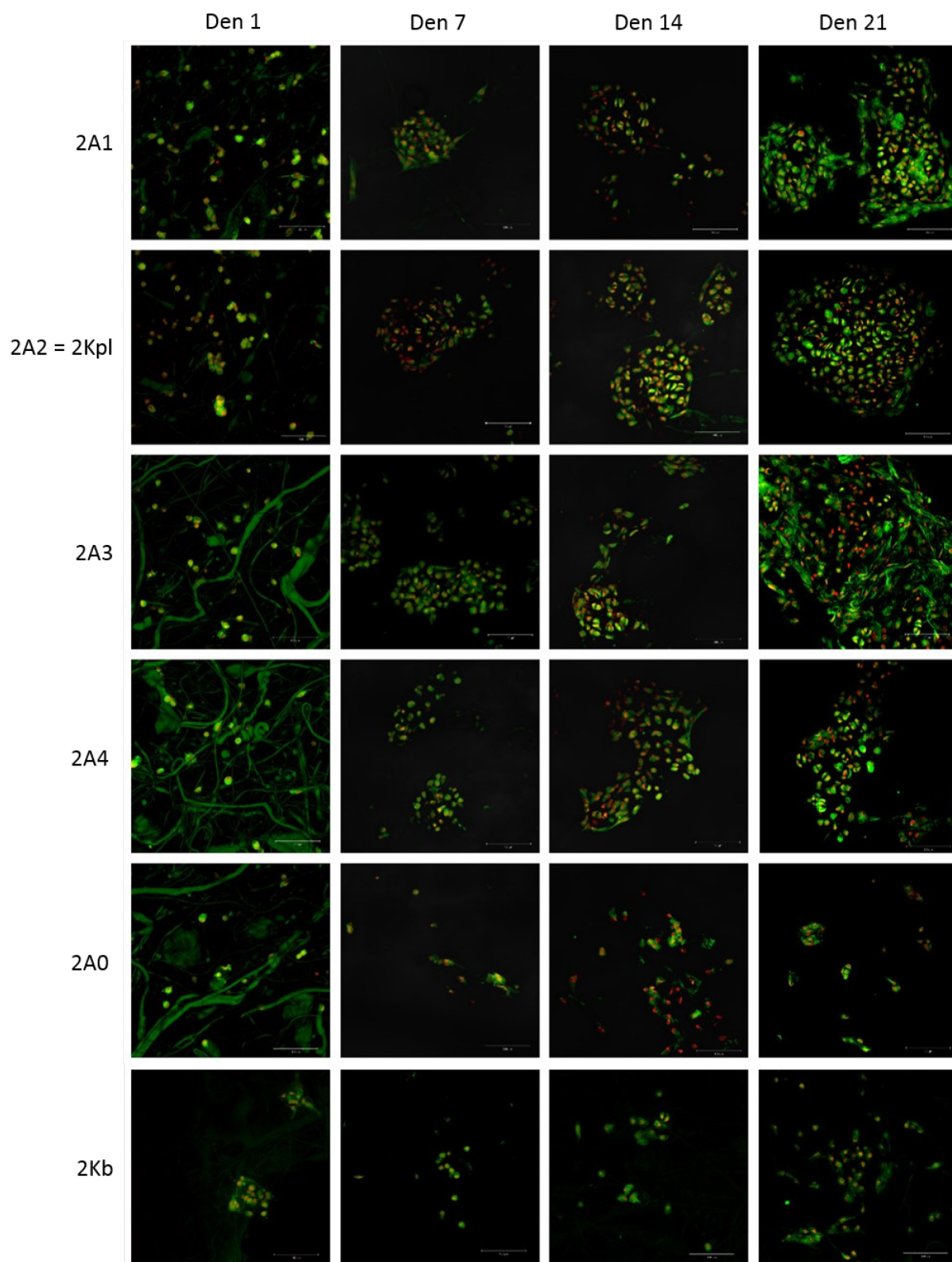
V den 1 vidíme u všech buněk přibližně stejné množství buněčné DNA na nosičích, došlo tedy k úspěšné adhezi buněk na nosič. Množství DNA na nosičích se postupně zvyšovalo až do dne 21 u skupin 2A1-2A4. Skupina 2A0 a 2Kb měla v den 21 jen nepatrně vyšší množství DNA buněk, než 1. experimentální den. Nejvyšší množství DNA bylo detekováno na skupinách u skupin 2A1-2A4 v den 21. Statisticky signifikantní rozdíly se vyskytly již v den 1 u skupiny 2A0 vůči skupině 2Kb. V den 7 byl rozdíl mezi skupinou 2A4 vůči skupinám 2A2 (odpovídá 2Kpl) a 2A0. V den 10 byl statisticky významný rozdíl u skupin 2A2 a 2A3 vůči skupině 2Kb. V den 14 u skupiny 2A1 vůči 2Kb a u skupiny 2A2 vůči 2A0 a 2Kb. V den 21 se rozdíly projeví u skupin 2A1-2A4 vůči skupinám 2A0 a 2Kb.

### 3.3.2.3

### Konfokální mikroskopie

Adheze buněk byla pozorována pomocí konfokální mikroskopie. Dále byl pozorován jejich růst v průběhu pokusu (viz obr. č. 23). U všech skupin byla s použitím konfokálního mikroskopu potvrzena adheze primárních chondrocytů na PCL nosič. U skupin 2A1-2A4 a 2A0 byly v den 1 pozorovány samostatné buňky, u negativní kontroly 2Kb se nacházely v malých skupinách. Ve dnech 7 a 14 se vytvářely u všech skupin kromě skupiny 2A0 a 2Kb

velké shluky buněk typické pro chondrocyty. V den 21 se u skupin 2A0 a 2Kb vytvářely spíše menší shluky buněk, oproti tomu skupiny 2A1-2A4 měly na povrchu nosičů už velké kolonie



buněk.

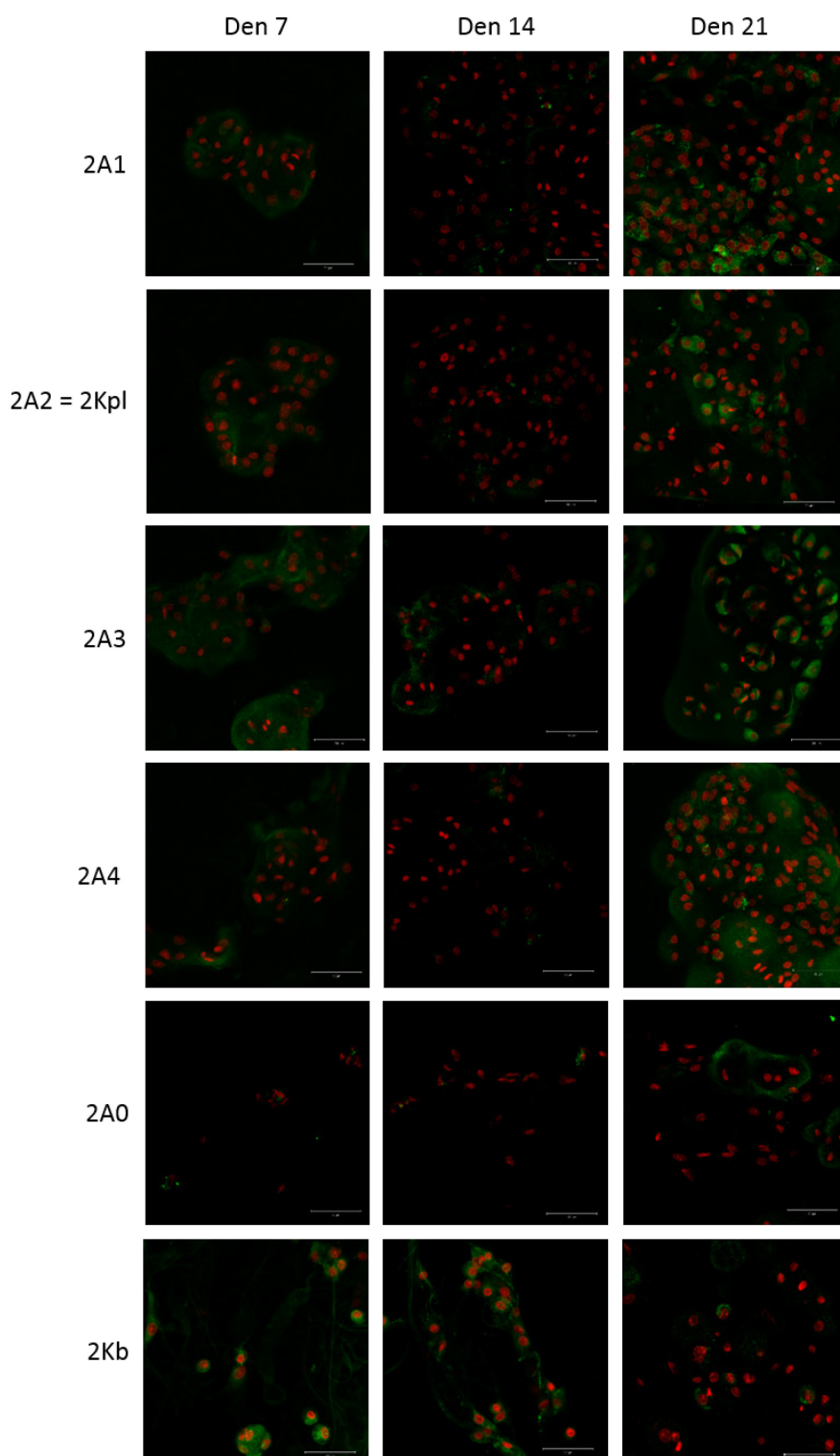
**Obr. č. 23 - Vizualizace adheze a proliferace buněk pomocí konfokální mikroskopie v experimentu č. 2:** Skupiny 2A1, 2A2 (2Kpl - pozitivní kontrola), 2A3, 2A4, 2A0 a negativní kontrola 2Kb byly pozorovány ve

dnech 1, 7 14 a 21. Červeně obarvená jádra propidium jodidem a zeleně membránové struktury pomocí DiOC6(3). Měrka u všech obrázků ve velikosti 100  $\mu\text{m}$ , zvětšení 100x.

#### **3.3.2.4 Immunobarvení prokolagenu typu II**

Prokolagen typu II byl zobrazen pomocí imunobarvení konfokální mikroskopií ve dnech 7, 14 a 21 (viz obr. č. 24).





**Obr. č. 24 - Imunobarvení prokolagenu typu II v experimentu č. 2:** Prokolagen typu II detekován pomocí primární protilátky proti prokolagenu typu II a sekundární protilátky Alexa fluor 488. Na obrázcích je zobrazen zeleně. Jádra svítí červeně po barvení propidium jodidem. Skupiny 2A1, 2A2 (odpovídá 2Kpl – pozitivní kontrola), 2A3, 2A4, 2A0 a negativní kontrola 2Kb pozorovány ve dnech 7 14 a 21. Měrka u všech obrázků ve velikosti 50  $\mu\text{m}$ , zvětšení 200x.

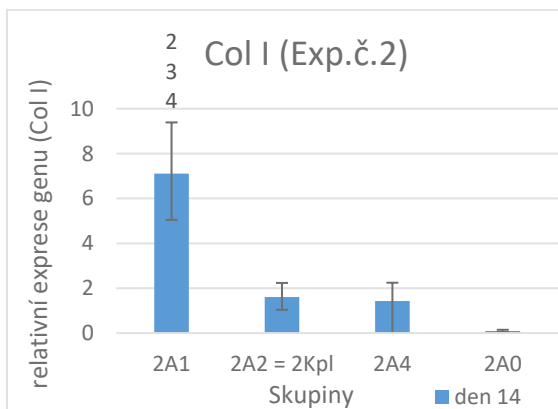
Prokolagen typu II byl detekován ve větším množství až 21. den a to u skupin 2A1-2A4. U skupin 2A0 a 2Kb se také vytvářel, ale nebyl příliš viditelný.



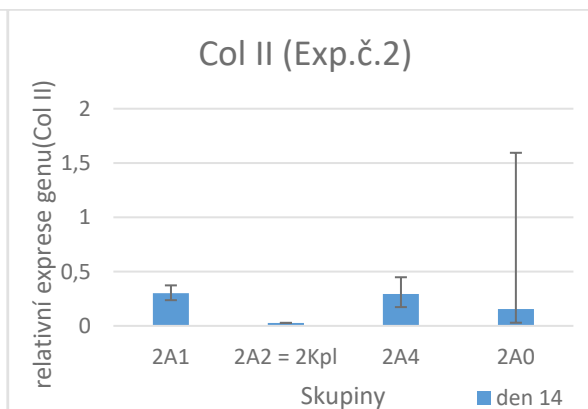
### 3.3.2.5

### RT-PCR

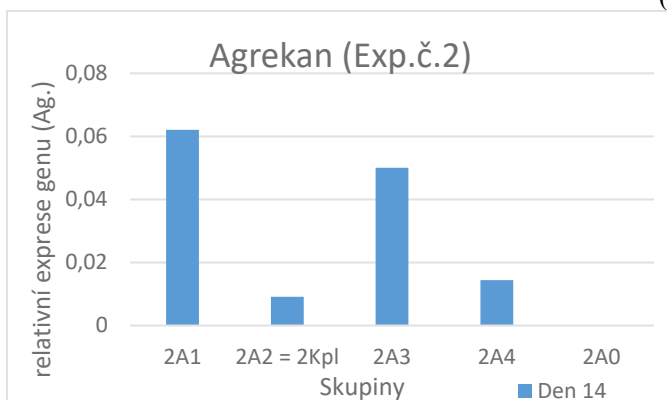
Expresce kolagenu typu I, kolagenu typu II a agrekanu byla změřena pomocí metody RT-PCR. metody RT-PCR byla 14. a 21. den změřena exprese genů pro kolagen typu I a typu II a 14. den pro agrekan (viz grafy č. 9, 10 a 11).



**Graf č. 9: Relativní exprese genu pro kolagen I (exp. č. 2)**



**Graf č. 10: Relativní exprese genu pro kolagen II (exp. č. 2)**



**Graf č. 11: Relativní exprese genu pro agrekan (exp. č. 2)**

Pozn. ke grafu č. 9: Statisticky významné rozdíly mezi skupinami jsou značeny číslem nad sloupci (2A1=1, 2A2(2Kpl)=2, 2A4=3, 2A0=4),  $p < 0,05$ . Pozn. ke grafu 11: Statisticky významné rozdíly mezi skupinami jsou značeny číslem nad sloupci (2A1=1, 2A2(2Kpl)=2, 2A3=3, 2A4=4, 2A0=5)

Gen pro kolagen typu I nebyl exprimován ve skupině 2A0, u ostatních byla vidět mírná exprese, nejvíce u skupiny 2A1, se statisticky významným rozdílem vůči skupinám 2A2, 2A4 a 2A0. Gen pro kolagen typu II se exprimoval o něco více ve skupině 2A1, 2A4, ve skupině 2A2 = 2Kpl se skoro neexprimoval, skupiny byly bez statisticky významných rozdílů. Kolagen typu I a II nebyl v tomto pokusu měřen u skupiny 2A3, neboť zde nebyla dostatečná koncentrace RNA, potřebná pro metodu RT-PCR. Agrekan byl detekován u skupin 2A1-2A4, avšak pouze z dupletu vzorků, tedy bez statistiky, můžeme zde pozorovat trend zvýšení u skupiny 2A1 a 2A3.

### 3.3.3 Experiment č. 3 – Vliv dexametazonu v médiu bez dalších suplementů na adhezi, proliferaci a diferenciaci primárních chondrocytů

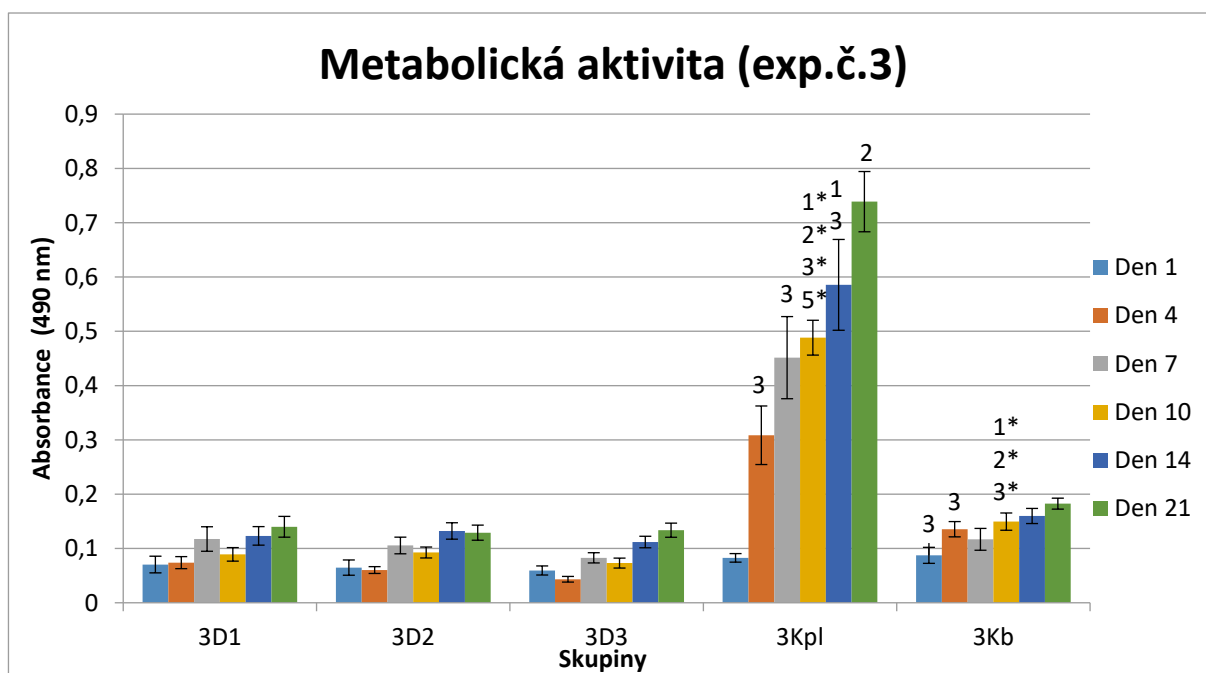
Kromě testování A2P byl vybrán druhý suplement chondrogenního média a to DEX. V pokusu č. 3 byly vytvořeny 3 skupiny s DEX v médiu bez dalších přidaných suplementů (tabulka č. 6). K vzorkům byla opět vytvořena pozitivní kontrola 3Kpl s plným chondrogenním médiem a negativní kontrola 3Kb s médiem bez suplementů. Primární chondrocyty byly nasazeny na stejný PCL nosič jako v pokusu č.1.

**Tabulka č. 6:** Označení skupin a koncentrací médií v pokusu č.3

Skupina	Médium	Nosič
3D1	IMDM, FBS 10%, ATB 1%, L-glutamin (800 mM), DEX (10 nM)	PCL
3D2	IMDM, FBS 10%, ATB 1%, L-glutamin (800 mM), DEX (100 nM)	PCL
3D3	IMDM, FBS 10%, ATB 1%, L-glutamin (800 mM), DEX (1000 nM)	PCL
3Kpl (kontrola - pozitivní)	IMDM, FBS 10%, ATB 1%, L-glutamin (800 mM), A2P (50 µg/ml), DEX (100 nM), ITS-X 1%	PCL
3Kb (kontrola - negativní)	IMDM, FBS 10%, ATB 1%, L-glutamin (800 mM)	PCL

#### 3.3.3.1 MTS test

Metabolická aktivita a viabilita buněk byla změřena MTS testem ve dnech 1, 3, 7, 10, 14 a 21 (graf č. 12).

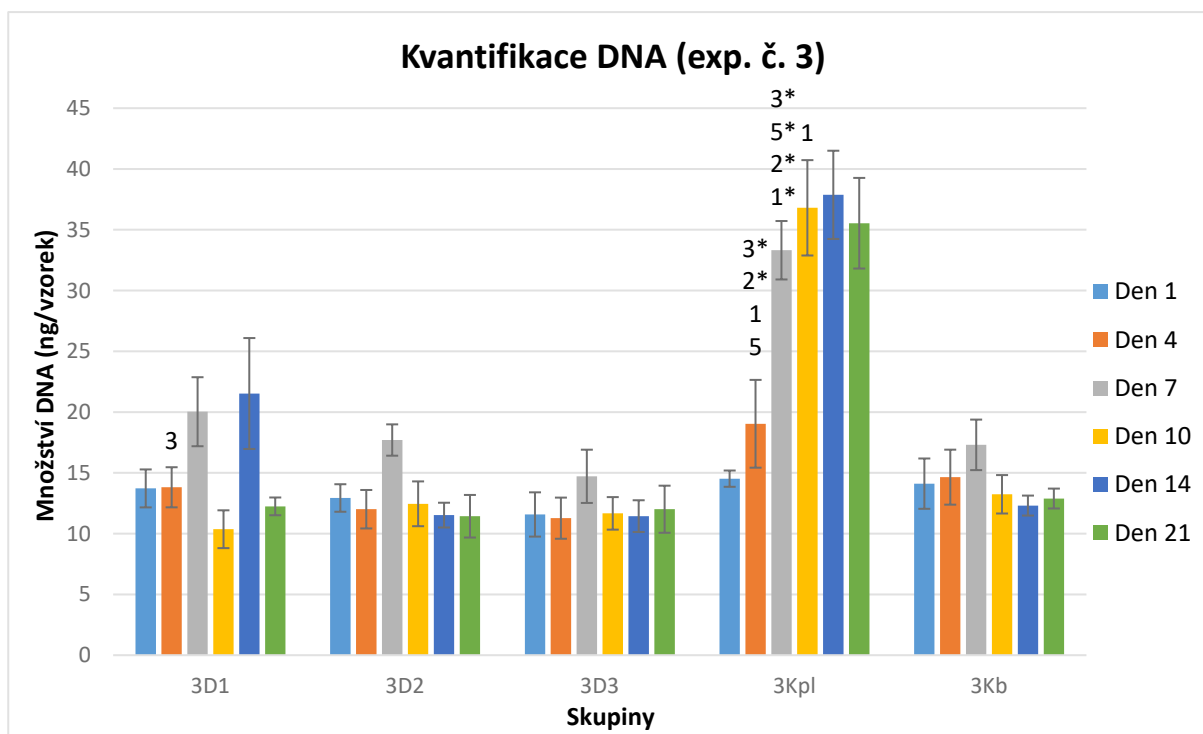


**Graf č. 12 - Metabolická aktivita buněk v experimentu č. 3:** DEX volně přidán v médiu ve 3 koncentracích (skupiny 3D1-3D3). Naměřené hodnoty absorbance ve dnech 1, 3, 7, 10, 14 a 21 MTS testem jsou vyneseny v grafu. Skupina 3Kpl – pozitivní kontrola (přidáno diferenciační médium). Skupina 3Kb – negativní kontrola (přidáno růstové médium). Statisticky významné rozdíly mezi skupinami jsou značeny číslem nad sloupci (3D1=1, 3D2, 3D3=3, 3Kpl=4, 3Kb=5),  $p < 0,05$  a  $*p < 0,001$ .

První den pozorujeme nízkou metabolickou aktivitu. Největších hodnot dosahovala skupina 3Kpl všechny experimentální dny. Skupiny 3D1-3D3 vykazovaly až do dne 21 velmi nízkou metabolickou aktivitu, dokonce menší než skupina 3Kb, ta byla velmi málo metabolicky aktivní. U všech skupin docházelo k postupnému narůstání metabolické aktivity ode dne 1 do dne 21, u skupiny 3Kpl velmi výrazně, u ostatních skupin pouze mírně. Signifikantní statistický rozdíl byl zaznamenán již v den 1 u skupiny 3Kb vůči skupině 3D3. Podobně i v den 4 u skupin 3Kpl a 3Kb vůči 3D3 a v den 7 u 3Kpl vůči 3D3. V den 10 byly dále pozorovány rozdíly u skupiny 3Kpl vůči skupinám 3D1, 3D2, 3D3 a 3Kb. U skupiny 3Kb byl signifikantní statistický rozdíl zaznamenán také v den 10 vůči skupinám 3D1, 3D2 a 3D3. V den 14 byl rozdíl zaznamenán již pouze u skupiny 3Kpl vůči 3D1 a 3D3 a podobně v den 21 u skupiny 3Kpl vůči 3D2.

### 3.3.3.2 Kvantifikace buněčné DNA

Množství buněčné DNA bylo změřeno Picogreen testem ve dnech 1, 3, 7, 10, 14 a 21 (graf č. 13).

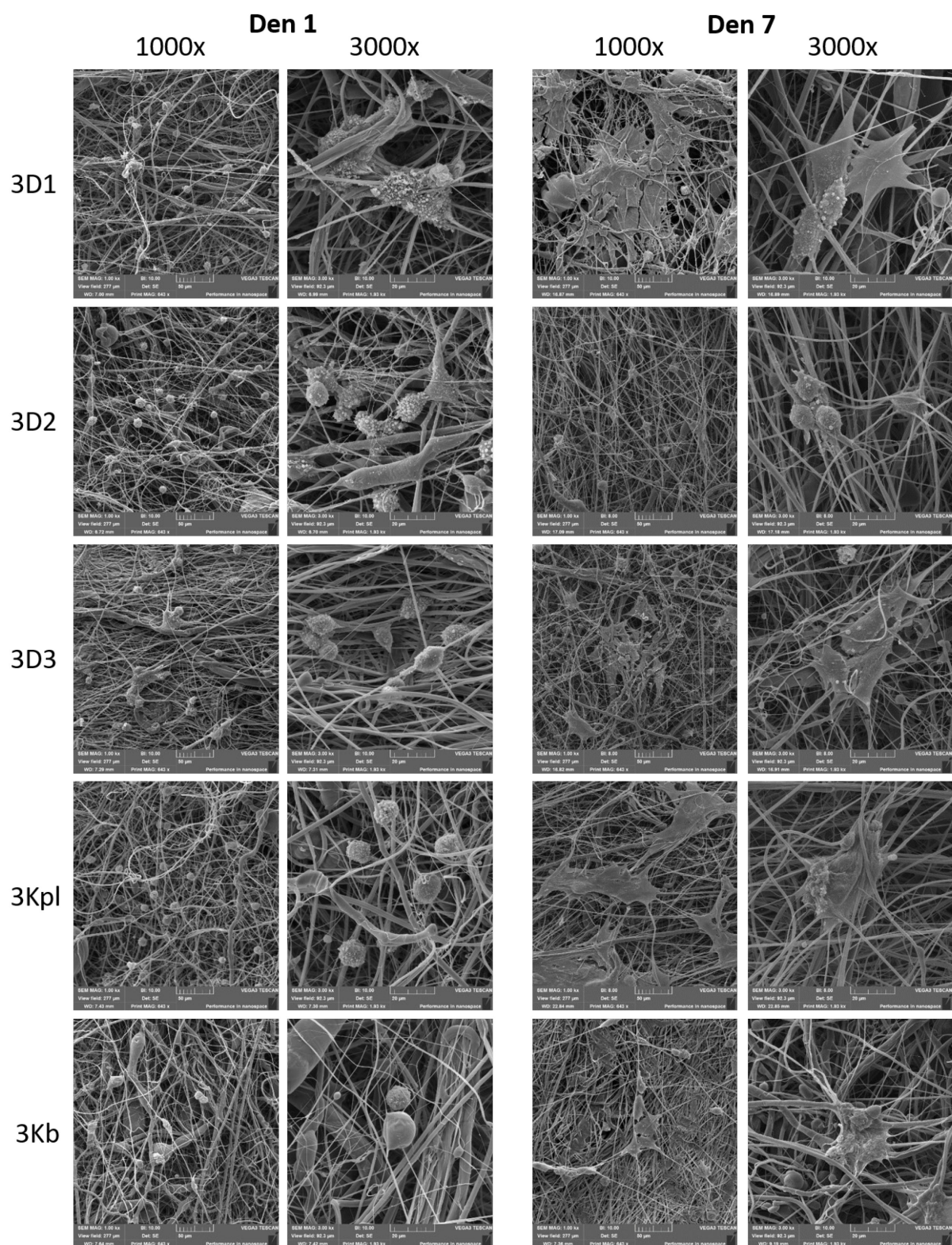


**Graf č. 13: Množství DNA v experimentu č. 3:** DEX volně přidán v médiu ve 3 koncentracích (skupiny 3D1-3D3). Hodnoty naměřeného množství DNA v ng/vzorek). Skupina 3Kpl – pozitivní kontrola (přidáno diferenciační médium). Skupina 3Kb – negativní kontrola (přidáno růstové médium). Statisticky významné rozdíly mezi skupinami jsou značeny číslem nad sloupci (3D1=1, 3D2, 3D3=3, 3Kpl=4, 3Kb=5),  $p < 0,05$  a \* $p < 0,001$ .

V den 1 došlo k adhezi buněk na nosič, u všech skupin vidíme podobnou hodnotu obsahu DNA. U skupin 3D1-3D3 se množství DNA na nosičích téměř neměnilo, buňky příliš neproliferovaly. O něco vyšší je hodnota 7. den u skupin 3D1-3D3 a 3Kb. Poté se však hodnoty vrátily k původním. Největších hodnot dosahovala pozitivní kontrola 3Kpl, především v den 14, kdy bylo naměřeno  $37,87 \pm 3,63$  ng/vzorek. Signifikantní statistické rozdíly byly v den 4 mezi skupinou 3D1 a 3D3. U skupiny 3Kpl byl statisticky významný rozdíl v den 4 a 7 vůči všem ostatním skupinám (3D1-3D3 a 3Kb). V den 10 byl u skupiny 3Kpl rozdíl pouze vůči skupině 3D1.

### 3.3.3.3 Skenovací elektronová mikroskopie

Adheze na scaffold byla vizualizována pomocí SEM (viz obr. č. 25). V den 1 došlo k adhezi na nanovláknenný nosič, v den 1 si chondrocyty zachovávaly kulovitou morfologii, v den 7 pozorujeme již tvorbu shluků a změnu morfologie na protáhlejší fibroblastový tvar, především u skupiny 3D1 a 3Kpl.



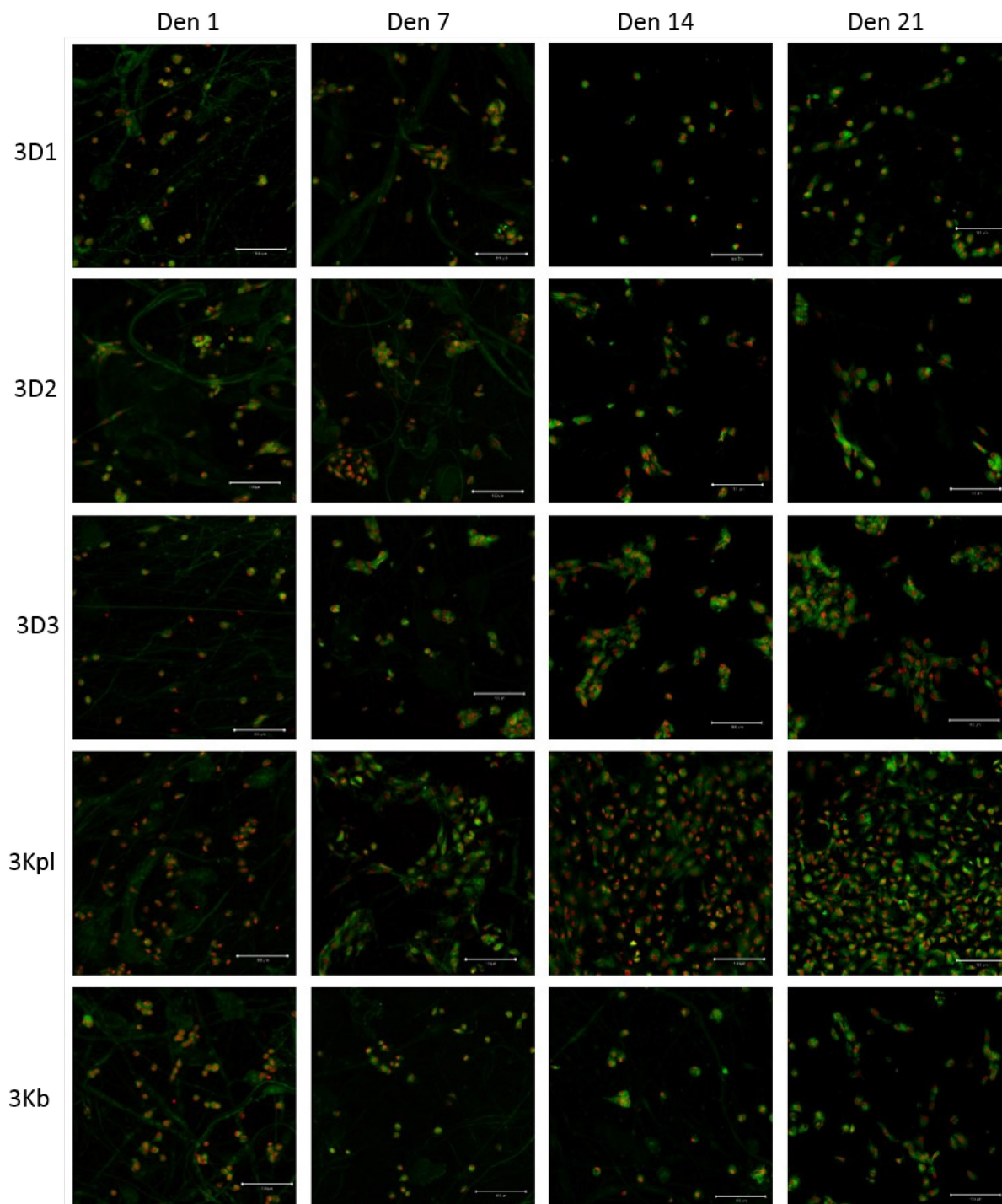
Obr. č. 25 – Vizualizace adheze na nanovláknový nosič pomosí SEM v den 1 a 7. Měrka 50  $\mu\text{m}$  (zvětšení 1000x) a 20  $\mu\text{m}$  (zvětšení 3000x).



### 3.3.3.4

### Konfokální mikroskopie

Adheze buněk na nosič byla pozorována pomocí konfokální mikroskopie (Obrázek č. 26).

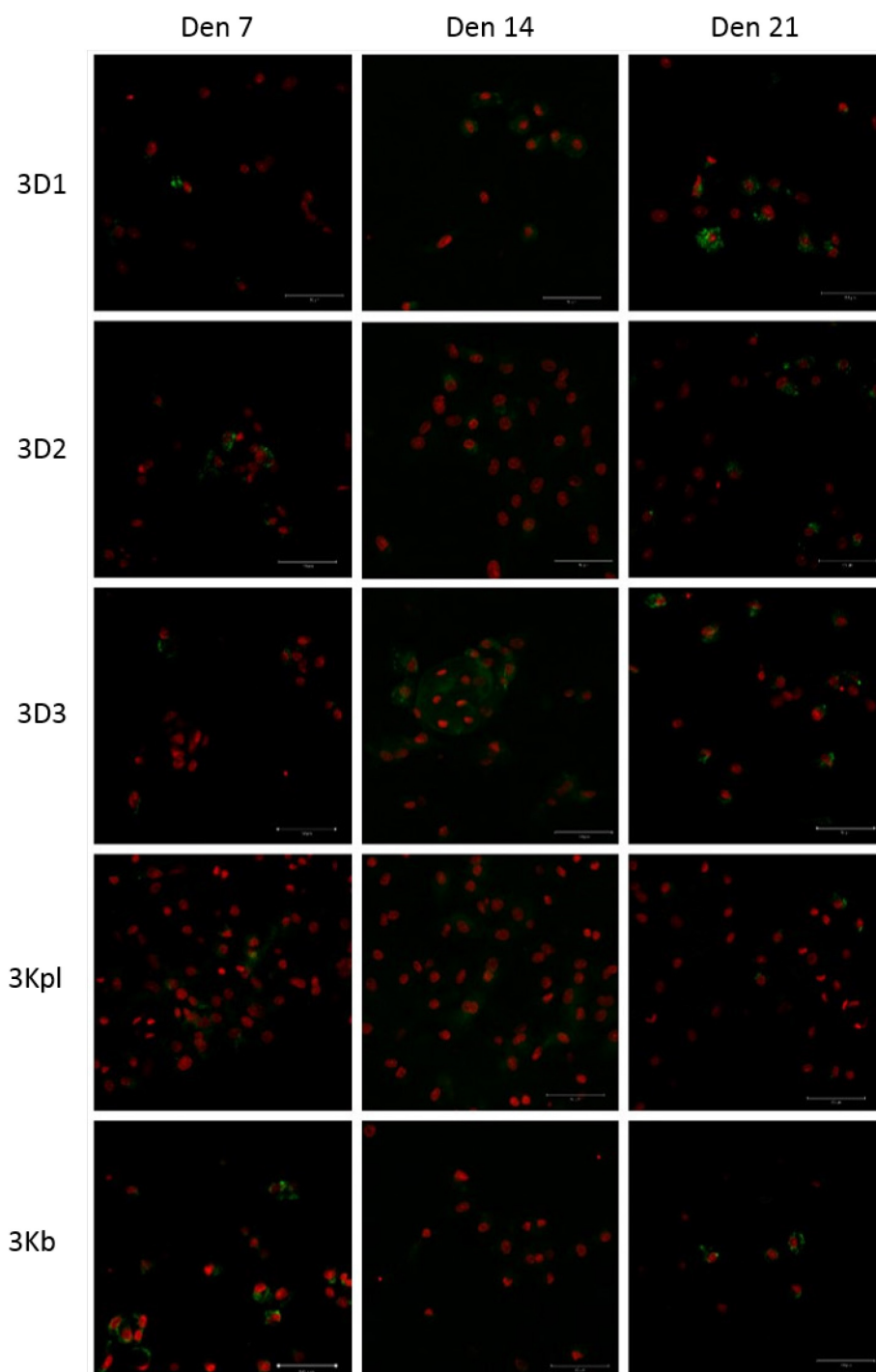


**Obr. č. 26 - Vizualizace adheze a proliferace buněk pomocí konfokální mikroskopie v experimentu č. 3:** Skupiny 3D1, 3D2, 3D3 pozorovány ve dnech 1, 7 14 a 21. Červeně obarvená jádra propidium jodidem a zeleně membránové struktury pomocí DiOC6(3). Skupina 3Kpl – pozitivní kontrola (přidáno diferenciační médium). Skupina 3Kb – negativní kontrola (přidáno růstové médium). Měrka u všech obrázků ve velikosti 100  $\mu\text{m}$ , zvětšení 100x.

První den došlo k adhezi buněk na nosič přibližně ve stejném množství ve všech skupinách. V den 7 se výsledky příliš nelišily od 1. dne. Ve dnech 14 a 21 však již buňky začaly vytvářet větší shluky, zvláště ve skupině 3D3. Skupina 3Kpl 21. den dosáhla konfluence.

#### **3.3.3.5 Immunobarvení prokolagenu typu II**

Prokolagen typu II byl pozorován pomocí imunobarvení a konfokální mikroskopie ve dnech 7, 14 a 21 (obrázek č. 27).



**Obr. č. 27 - Imunobarvení prokolagenu typu II v experimentu č. 3:** Prokolagen typu II detekován pomocí primární protilátky proti prokolagenu typu II a sekundární protilátky Alexa fluor 488. Na obrázcích je zobrazen zeleně. Jádra svítí červeně po barvení propidium jodidem. Skupiny 3D1, 3D2, 3D3 pozorovány ve dnech 7, 14 a 21. Skupina 3Kpl – pozitivní kontrola (přidáno diferenciační médium). Skupina 3Kb – negativní kontrola (přidáno růstové médium). Měrka u všech obrázků ve velikosti 50  $\mu\text{m}$ , zvětšení 200x.

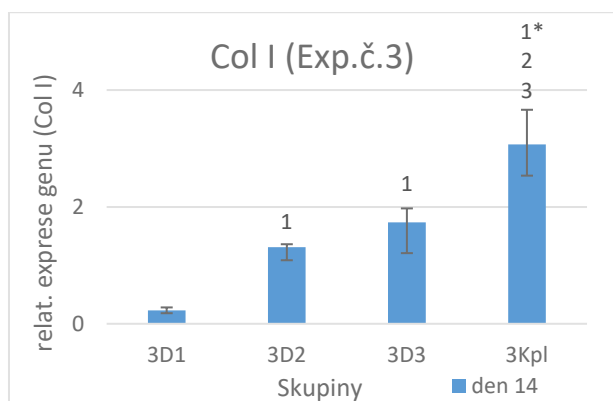
Prokolagen typu II byl pomocí této metody detekován v malém množství u skupin 3D1, 3D2, 3D3 a 3Kb ve dnech 7 a 21.



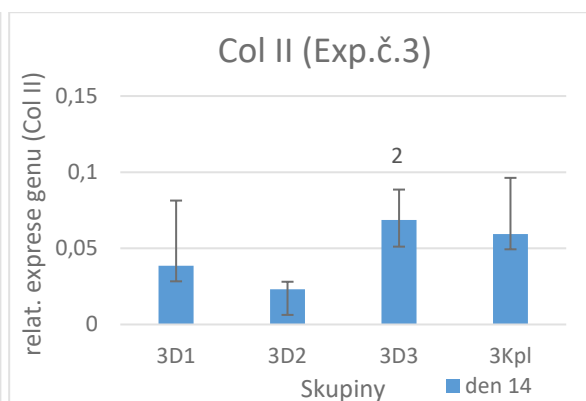
### 3.3.3.6

### RT-PCR

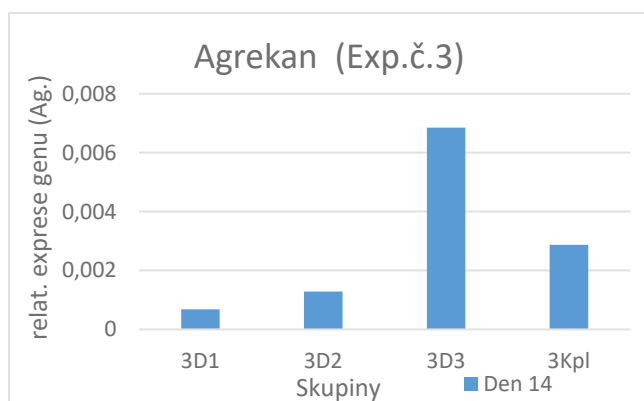
Pomocí metody RT-PCR byla stanovena exprese genů pro kolagen I, II a agrekan (viz grafy č. 14, 15 a 16).



**Graf č. 14: Relativní exprese genu pro kolagen I (exp. č. 3)**



**Graf č. 15: Relativní exprese genu pro kolagen II (exp. č. 3)**



**Graf č. 16: Relativní exprese genu pro agrekan (exp. č. 3)**

Pozn. ke grafům č. 14, 15, 16: Statisticky významné rozdíly mezi skupinami jsou značeny číslem nad sloupci (3D1=1, 3D2, 3D3=3, 3Kpl=4),  $p < 0,05$  a \* $p < 0,001$ .

Gen pro kolagen typu I se exprimoval v podobné míře u skupin 3D2 a 3D3, u skupiny 3D1 se exprimoval v nižším množství. Statisticky významný rozdíl byl pozorován mezi skupinami 3D2 a 3D3 vůči 3D1. Nejvíce byl exprimován u skupiny 3Kpl, u ní byly statisticky významné rozdíly vůči všem ostatním skupinám.

Gen pro kolagen typu II byl exprimován u všech skupin, u skupiny 3D2 o trochu méně, statisticky významný rozdíl byl pozorován mezi skupinami 3D3 vůči 3D2.

U genu pro agrekan pozorujeme zvýšený trend u skupiny 3D3 oproti ostatním skupinám.

### 3.3.4 Experiment č. 4 – Vliv dexametazonu v médiu s dalšími chondrogenními suplementy (A2P, ITS-X) na adhezi, proliferaci a diferenciaci primárních chondrocytů

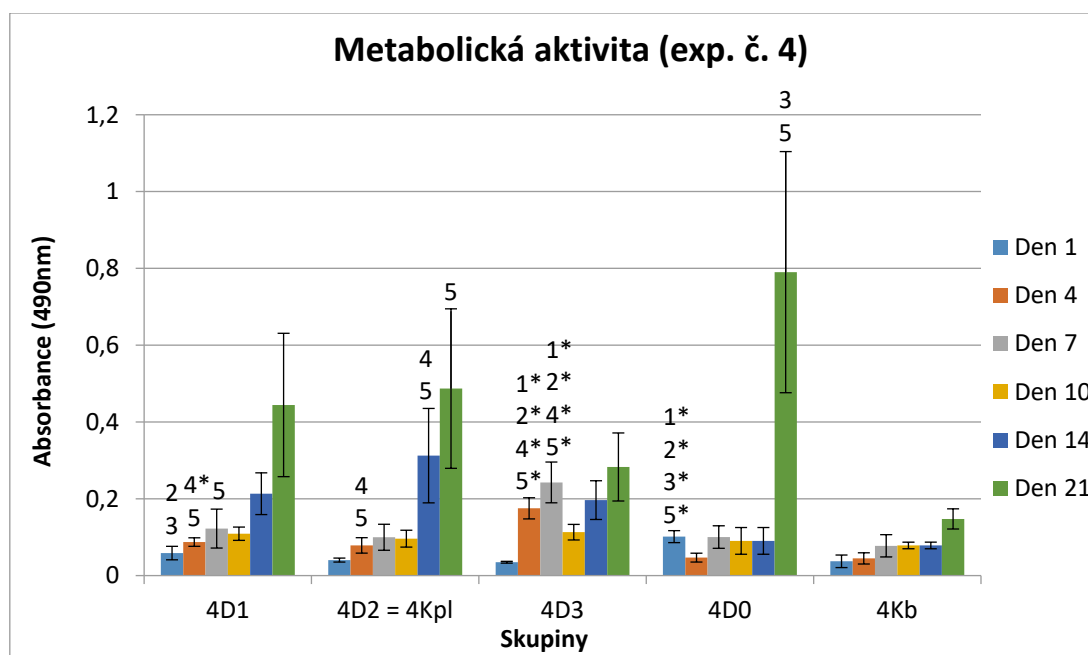
Ve čtvrtém experimentu byl DEX dále testován v souvislosti s působením dalších složek v médiu (A2P, ITS-X). Pracováno bylo se 4 skupinami vzorků s DEX v médiu s dalšími suplementy chondrogenního diferenciačního média (viz tab. č. 7). Skupiny 4D1, 4D2, 4D3 mají shodnou koncentraci DEX jako skupiny 3D1, 3D2, 3D3 v předchozím experimentu (exp. č. 3), avšak jsou v médiu doplněny o další suplementy. Byla vytvořena skupina 4D0 – skupina bez DEX, avšak s médiem s dalšími suplementy. Pozitivní kontrola 4Kpl s plným chondrogenním médiem odpovídá skupině 4D2. Negativní kontrola 4Kb obsahuje médium bez suplementů. Primární chondrocyty byly nasazeny na stejný PCL nosič jako v pokusu č.2.

**Tabulka č. 7:** Označení skupin a koncentrací médií v pokusu č.4

Skupina	Médium	Nosič
4D1	IMDM, FBS 10%, ATB 1%, L-glutamin (800 mM), DEX (10 nM), A2P (50 µg/ml) ITS-X 1%	PCL
4D2 = 4Kpl (kontrola – pozitivní)	IMDM, FBS 10%, ATB 1%, L-glutamin (800 mM), DEX (100 nM), A2P (50 µg/ml) ITS-X 1%	PCL
4D3	IMDM, FBS 10%, ATB 1%, L-glutamin (800 mM), DEX (1000 nM), A2P (50 µg/ml) ITS-X 1%	PCL
4D0	IMDM, FBS 10%, ATB 1%, L-glutamin (800 mM), A2P (50 µg/ml) ITS-X 1%	PCL
Kb (kontrola - negativní)	IMDM, FBS 10%, ATB 1%, L-glutamin (800 mM)	PCL

#### 3.3.4.1 MTS test

Metabolická aktivita chondrocytů byla změřena pomocí MTS metody 1., 3., 7., 10., 14. a 21. den (graf č. 17).

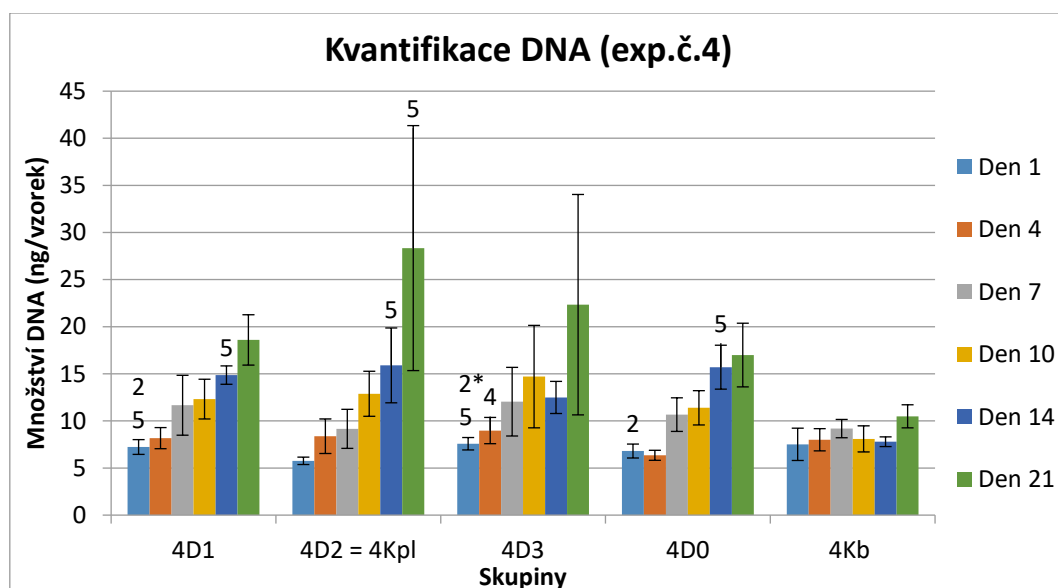


**Graf č. 17: Metabolická aktivita buněk v experimentu č. 4:** DEX volně přidán v médiu ve 3 koncentracích (skupiny 4D1-4D3) spolu s dalšími chondrogeními suplementy A2P a ITS-X. Skupina 4D2 = 4Kpl – pozitivní kontrola (přidáno diferenciační médium). Skupina 4Kb – negativní kontrola (přidáno růstové médium). Naměřené hodnoty absorbance ve dnech 1, 3, 7, 10, 14 a 21 MTS testem jsou vyneseny v grafu. Statisticky významné rozdíly mezi skupinami jsou značeny číslem nad sloupci (4D1=1, 4D2(4Kpl)=2, 4D3=3, 4D0=4, 4Kb=5),  $p < 0,05$  a  $*p < 0,001$ .

V den 1 pozorujeme nízkou metabolickou aktivitu buněk u všech skupin (hodnota u 4D0 má vyšší hodnotu než jaká by se očekávala - důvodem může být chyba pipetování). Podobně nízká se vyskytuje až do dne 14 u všech skupin s mírným vzestupem kromě skupiny 4D3, kde došlo v den 10 ke snížení metabolické aktivity. U všech skupin hodnota metabolické aktivity mírně vzrostla 21. den, u skupiny 4D0 vzrostla prudce. Největší hodnota absorbance byla změřena u skupiny 4D0 21. den a to  $0,79 \pm 0,31$ . Statisticky významné rozdíly byly patrné v den 1 u skupiny 4D1 vůči skupinám 4D2 a 4D3 a u skupiny 4D0 vůči všem ostatním skupinám. V den 4 u skupin 4D1 a 4D2 vůči 4D0 a 4Kb. U skupiny 4D3 byly pozorovány statisticky významné rozdíly vůči všem ostatním skupinám v den 4 a den 7. V den 7 byl ještě zaznamenán významný rozdíl u skupiny 4D1 vůči 4Kb. V den 14 byl pozorován rozdíl pouze u skupiny 4D2 vůči skupinám 4D0 a 4Kb. V den 21 pak u skupin 4D2 vůči 4Kb a 4D0 vůči 4D3 a 4Kb.

### 3.3.4.2 Kvantifikace buněčné DNA

Obsah buněčné DNA byl změřen metodou Picogreen 1., 3., 7., 10., 14. a 21. den (graf č. 18).

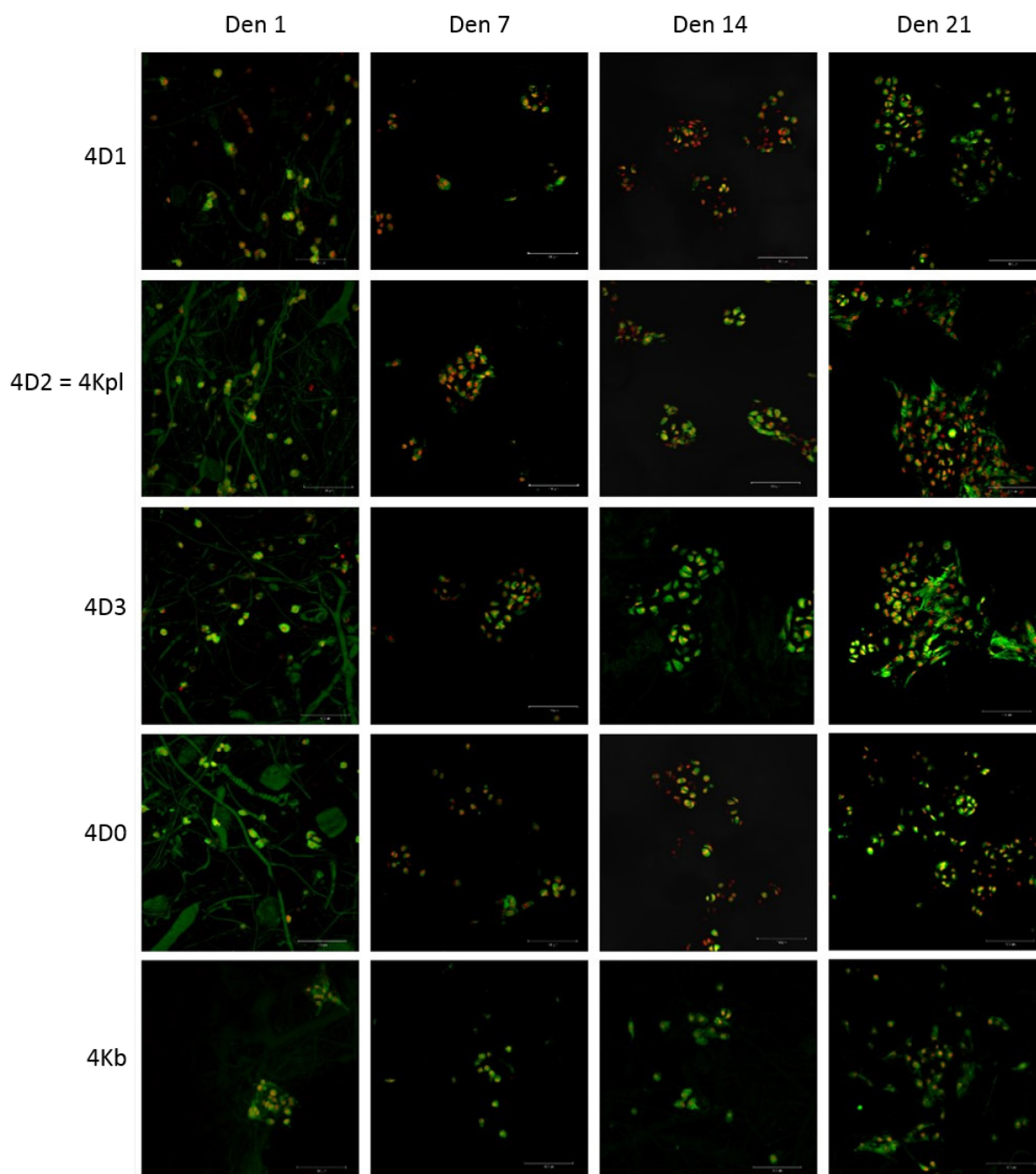


**Graf č. 18: Množství DNA v experimentu č. 4:** DEX volně přidán v médiu ve 3 koncentracích (skupiny 4D1-4D3) spolu s dalšími chondrogeními suplementy A2P a ITS-X. Hodnoty naměřeného množství DNA v ng/vzorek. Skupina 4D2 odpovídá pozitivní kontrole (přidáno diferenciační médium). Skupina 4Kb – negativní kontrola (přidáno růstové médium). Statisticky významné rozdíly mezi skupinami jsou značeny číslem nad sloupce (4D1=1, 4D2(4Kpl)=2, 4D3=3, 4D0=4, 4Kb=5),  $p < 0,05$  a  $*p < 0,001$ .

První den byl u všech skupin adheroval na nosič přibližně stejný počet buněk. Do dne 21 pozorujeme stoupající tendenci v množství DNA na nosičích u všech skupin, kromě skupiny 4Kb, kde byly hodnoty ze všech experimentálních dnů podobné hodnotě ze dne 1. Nejvyšší hodnota byla naměřena v den 21 u skupiny 4D2=4Kpl, avšak s velkou odchylkou. Až na tuto hodnotu si byly skupiny množstvím DNA v průběhu pokusu velmi podobné. Statisticky signifikantní rozdíl mezi skupinami byl pozorován již v den 1. U skupiny 4D1 byl statisticky významný rozdíl pozorován ve dnech 1 vůči 4D2 a 4Kb a v den 14 vůči 4Kb. U skupiny 4D2 byl rozdíl ve dnech 14 a 21 vůči 4Kb. Skupina 4D3 měla statisticky významný rozdíl v den 1 vůči 4D2 a 4Kb a v den 4 vůči 4D0. Skupina 4D0 pak měla rozdíl v den 1 vůči 4D2 a v den 14 vůči 4Kb.

### 3.3.4.3 Konfokální mikroskopie

Adheze a proliferace byla dále zkoumána pomocí konfokální mikroskopie (obrázek č. 28).



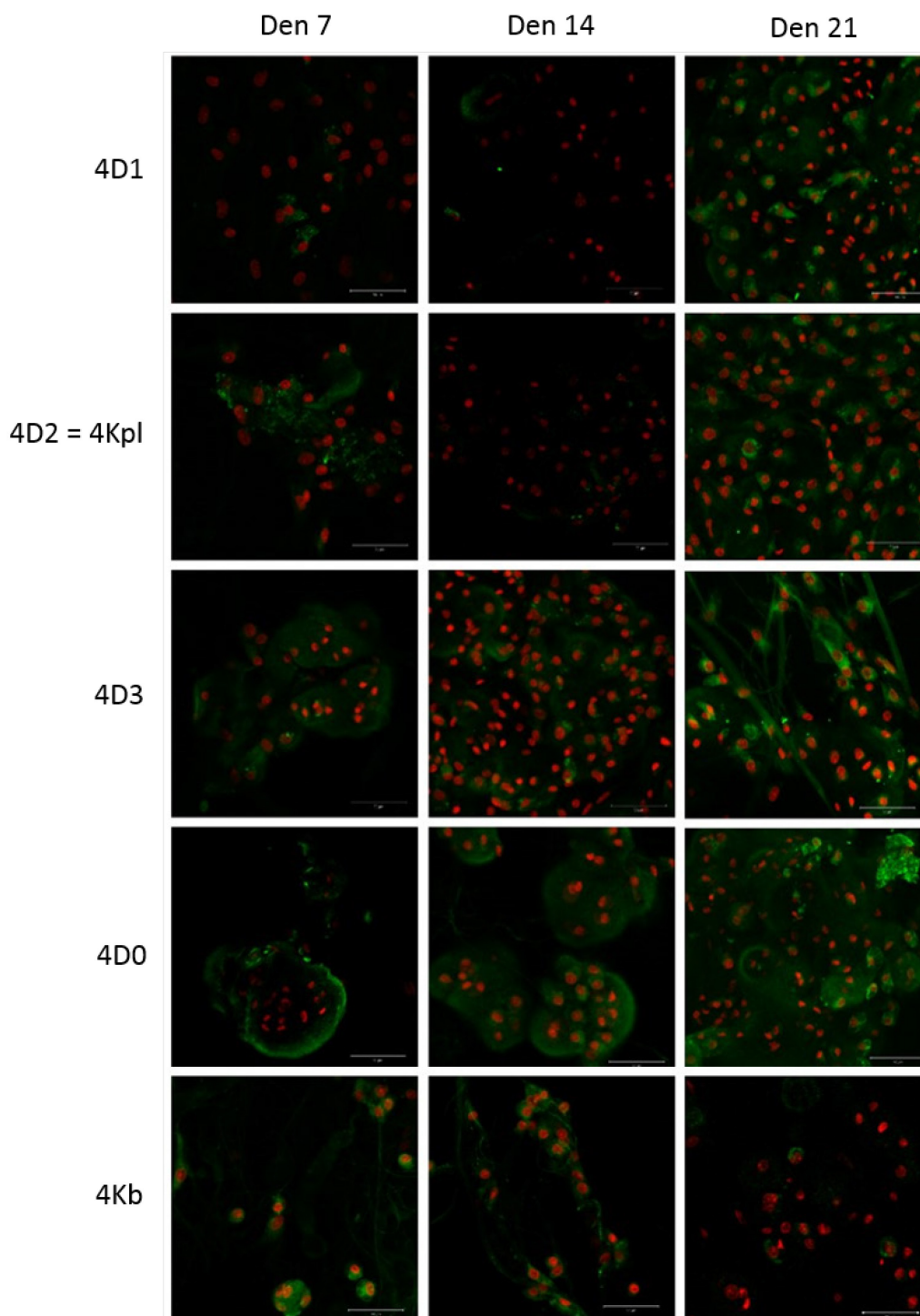
**Obr. č. 28 - Vizualizace adheze a proliferace buněk pomocí konfokální mikroskopie v experimentu č. 4:** Skupiny 4D1, 4D2 (odpovídá 4Kpl – pozitivní kontrola), 4D3, 4D0 a 4Kb (negativní kontrola) pozorovány ve dnech 1, 7 14 a 21. Červeně obarvená jádra propidium jodidem a zeleně membránové struktury pomocí DiOC6(3). Měrka u všech obrázků ve velikosti 100  $\mu\text{m}$ , zvětšení 100x.

V den 1 byla potvrzena buněčná adheze na nanovláknový nosič. Ode dne 7 buňky u všech skupin začaly vytvářet shluky. To se netýkalo pouze negativní kontroly 4Kb, kde začaly shluky vznikat až v den 21, jinak byly buňky spíše osamocené. V den 21 byly ve skupinách 4D1, 4D2, 4D3 pozorovatelné velké shluky buněk, největší asi u skupiny 4D3. Skupina 4D0 vytvářela spíš menší shluky.

### 3.3.4.4

### Imunobarvení prokolagenu typu II

Prokolagen typu II byl detekován pomocí imunobarvení ve dnech 7, 14 a 21 (obrázek č. 29).

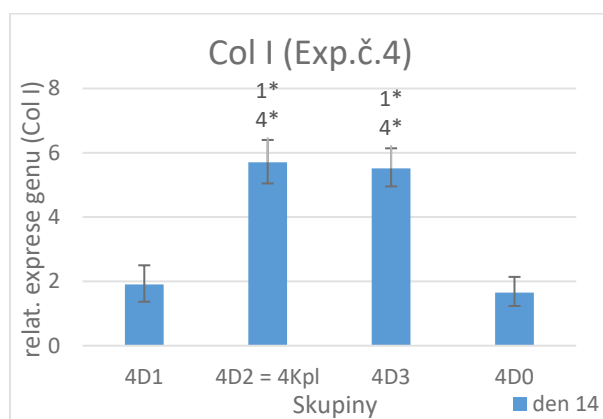


**Obr. č. 29 - Imunobarvení prokolagenu typu II v experimentu č. 4:** Prokolagen typu II detekován pomocí primární protilátky proti prokolagenu typu II a sekundární protilátky Alexa fluor 488. Na obrázcích je zobrazen zeleně. Jádra svítí červeně po barvení propidium jodidem. Skupiny 4D1, 4D2 (odpovídá 4Kpl – pozitivní kontrola), 4D3, 4D0 a 4Kb (negativní kontrola) pozorovány ve dnech 1, 7 14 a 21. Měrka u všech obrázků ve velikosti 50  $\mu\text{m}$ , zvětšení 200x.

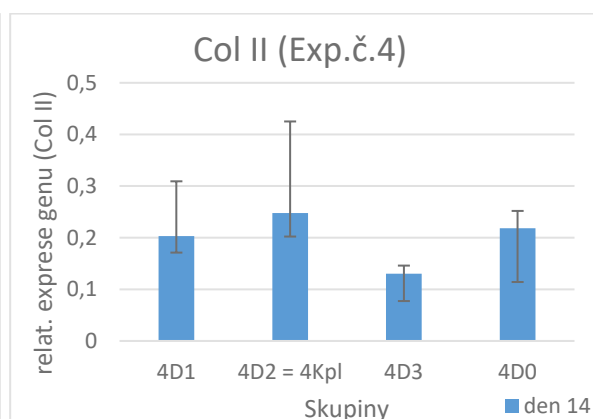
Prokolagen typu II byl touto metodou detekován u skupin 4D1, 4D2, 4D3 a 4D0 ve dnech 7, 14 a 21. Byl nejvíce viditelný v den 21 u skupin 4D1, 4D2, 4D3, 4D0. U skupiny 4Kb byl pozorovatelný více v den 7.

### 3.3.4.5 RT-PCR

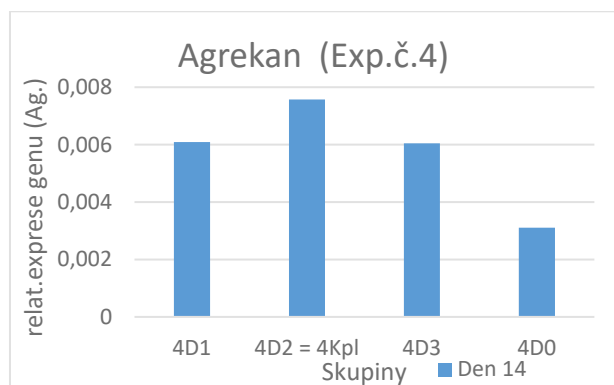
Expresí genu pro kolagen typu II společně s expresí genu pro kolagen typu I a genu pro agrekan byl změřen a vyhodnocen za pomoci metody RT-PCR (viz grafy č. 19, 20 a 21).



**Graf č. 19 – Relativní exprese genu pro kolagen I** (ex. č. 4)



**Graf č. 20 – Relativní exprese genu pro kolagen II** (ex. č. 4)



**Graf č. 21 – Relativní exprese genu pro agrekan** (ex. č. 4)

Pozn. ke grafům č. 19, 20, 21: Statisticky významné rozdíly mezi skupinami jsou značeny číslem nad sloupce (4D1=1, 4D2(4Kpl)=2, 4D3=3, 4D0=4), \* $p < 0,001$ .

Gen pro kolagen typu I se exprimoval nejvíce u skupin 4D2 a 4D3, které vykazovaly podobnou hodnotu a byl u nich pozorován statisticky signifikantní rozdíl vůči skupinám 4D0 a 4D1. Skupiny měly malé směrodatné odchylky. Expresí genu pro kolagen typu II byla u skupin podobná, bez statisticky významných rozdílů, byly zde větší směrodatné odchylky. U agrekanu můžeme pozorovat vyšší trend u skupin s DEX - 4D1, 4D2, 4D3, u skupiny 4D0 byla hodnota exprese snížena.

### 3.4 VLIV MALÝCH CHONDROGENNÍCH MOLEKUL INKORPOROVANÝCH DO VLÁKEN

#### 3.4.1 Experiment č. 5 – Inkorporace askorbátu-2-fosfátu do PCL nanovláken s dalšími suplementy a sledování jeho vlivu na adhezi, proliferaci a diferenciaci chondrocytů

A2P byl v tomto pokusu zvlákněn do PCL nanovláken spolu s dalšími suplementy chondrogenního média (DEX, ITS-X). Vytvořeny byly 3 skupiny odpovídající koncentračně askorbátovým skupinám testovaným v médiu (pokus č. 1 a 2). DEX a ITS-X byly použity v koncentracích, ve kterých se vyskytují v diferenciačním chondrogenním médiu a byly pro skupiny 5A1 – 5A3 stejné. Ke skupinám byly vytvořeny kontroly 5Kpl s plným chondrogenním médiem a 5Kb s médiem bez suplementů (viz tab. č. 8). Kontroly obsahovaly samotné PCL, do něhož látky nebyly zvlákněny. Ke skupinám byla navíc vytvořena další skupina 5PLM, která obsahovala dvojnásobné množství suplementů plného chondrogenního média zvlákněné v PCL nanovlákněch.

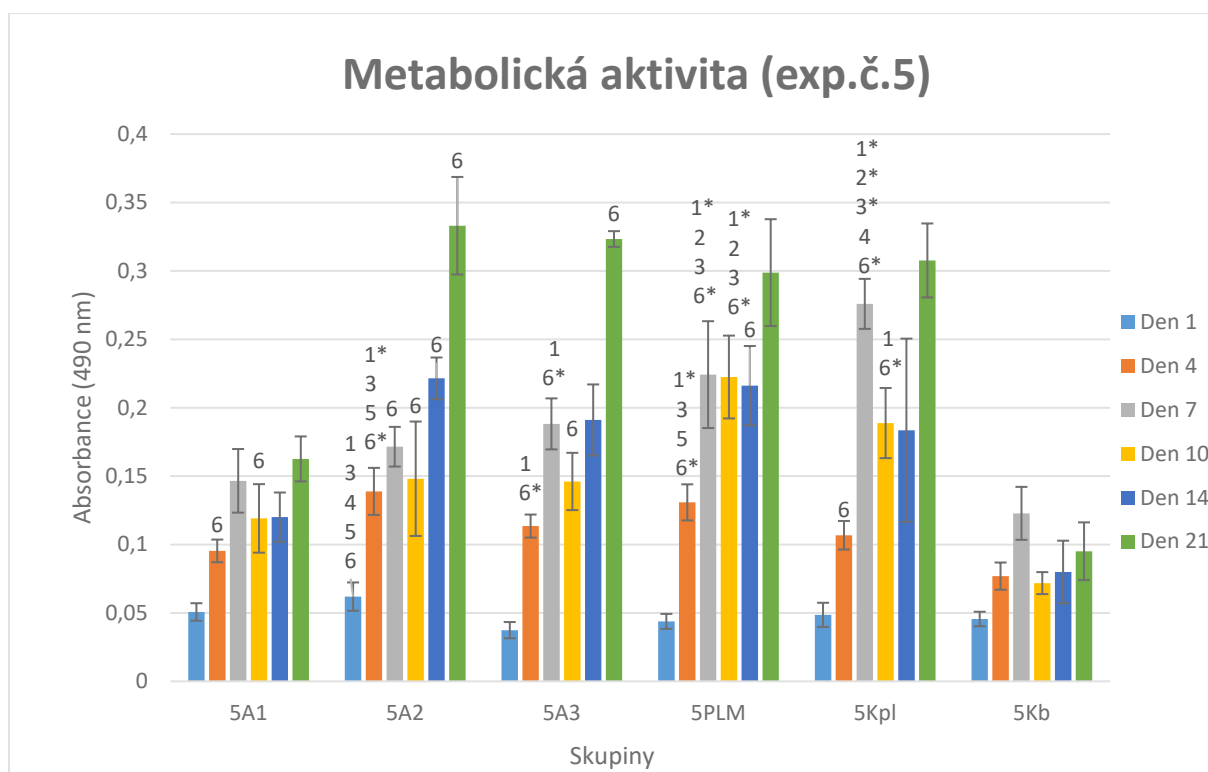
Tabulka č. 8: Označení skupin a koncentrací médií v pokusu č.5

Skupina	Médium	Suplement/nosič
5A1	IMDM, FBS 10%, ATB 1% L-glutamin (400 mM),	<b>A2P (25 µg/ml), DEX (100 nM), ITS-X (1%),</b> zvlákněné v PCL nanovlákněch
5A2	IMDM, FBS 10%, ATB 1%, L-glutamin (400 mM)	<b>A2P (50 µg/ml) DEX (100 nM), ITS-X (1%),</b> zvlákněné v PCL nanovlákněch
5A3	IMDM, FBS 10%, ATB 1%, L-glutamin (400 mM),	<b>A2P (100 µg/ml) DEX (100 nM), ITS-X (1%),</b> zvlákněné v PCL nanovlákněch
5PLM	IMDM, FBS 10%, ATB 1%, L-glutamin (400 mM)	<b>A2P (100 µg/ml) DEX (200 nM), ITS-X (2%),</b> zvlákněné v PCL nanovlákněch
5Kpl (kontrola - pozitivní)	IMDM, FBS 10%, ATB 1%, L-glutamin (400 mM), A2P (50 µg/ml), DEX (100 nM), ITS-X 1%	PCL
5Kb (kontrola - negativní)	IMDM, FBS 10%, ATB 1%, L-glutamin (400 mM)	PCL

##### 3.4.1.1 MTS

Metabolická aktivita byla změřena MTS testem ve dnech 1, 3, 7, 10, 14 a 21 (graf č. 22).

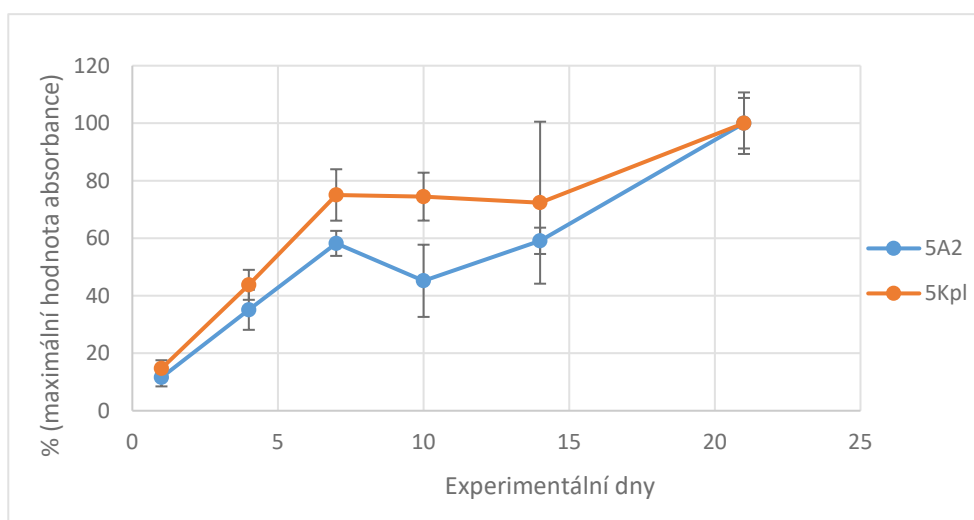




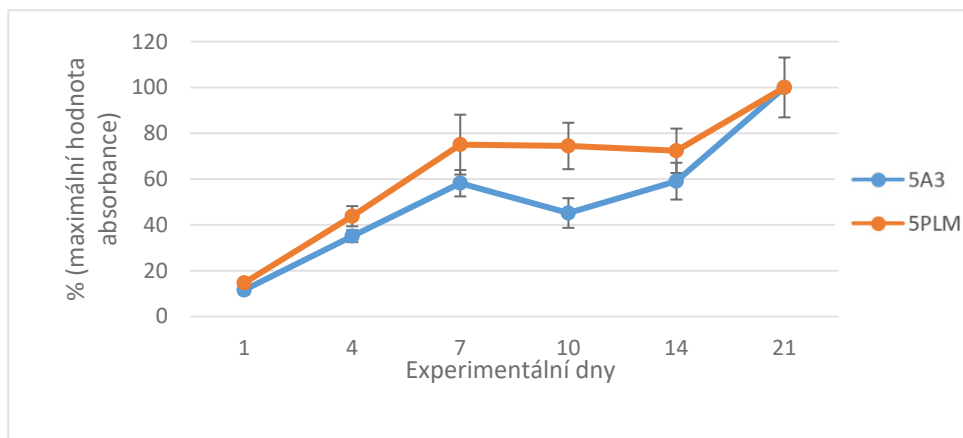
**Graf č. 22 - Metabolická aktivita buněk v experimentu č. 5:** A2P zvlákněn na nanovlákněného nosiče ve 4 koncentracích (skupiny 5A1-5A4) spolu s dalšími chondrogeními suplementy DEX a ITS-X. Skupina 5PLM obsahuje zvlákněnou dvojnásobnou koncentraci chondrogeních suplementů (A2P, DEX, ITS-X). Skupina 5Kpl – pozitivní kontrola (přidáno diferenciální médium). Skupina 5Kb – negativní kontrola (přidáno růstové médium). Naměřené hodnoty absorbance ve dnech 1, 3, 7, 10, 14 a 21 MTS testem jsou vyneseny v grafu. Statisticky významné rozdíly mezi skupinami jsou značeny číslem nad sloupci (5A1=1, 5A2=2, 5A3=3, 5PLM=4, 5Kpl=5, 5Kb=6),  $p < 0,05$  a  $*p < 0,001$ .

V den 1 měly buňky všech skupin nízkou metabolickou aktivitu, u všech skupin přibližně stejnou. Docházelo k postupnému navyšování metabolické aktivity do dne 21 u všech skupin, s malým propadem v den 10. Hodnoty byly vyšší 7. a 21. den. Obecně si byly metabolické hodnoty skupin 5A2, 5A3, 5PLM a 5Kpl poměrně podobné. Dosahovaly maxima v den 21. Nižší, ale navzájem si podobné hodnoty metabolické aktivity byly naměřeny i u skupin 5A1 a 5Kb. Nejvyšší hodnoty metabolické aktivity dosáhla skupina 5A2 v den 21, dále skupina 5A3 v den 21, 5PLM v den 21 a kontrola 5Kpl v den 21. Statisticky signifikantní rozdíly byly pozorovány již v den 1. U skupiny 5A1 byl významný statistický rozdíl pozorován ve dnech 4 a 10 vůči 5Kb. Skupina 5A2 měla rozdíl v den 1 vůči všem skupinám, v den 4 vůči všem skupinám kromě 5PLM, a v den 7, 10, 14 a 21 vůči skupině 5Kb. Skupina 5A3 měla statisticky významné rozdíly v den 4 a 7 vůči skupinám 5A1 a 5Kb a v den 10 a 21 pouze vůči skupině 5Kb. Skupina 5PLM měla rozdíl v den 4 vůči všem skupinám kromě 5A2, v den 7 a 10 vůči všem skupinám kromě 5Kpl a v den 14 pouze vůči skupině 5Kb. Skupina 5Kpl měla statisticky významný rozdíl vůči 5Kb v den 4, dále v den 7 vůči všem skupinám a v den 10 pouze vůči skupinám 5A1 a 5Kb.

Při porovnání metabolických aktivit dvojice 5A2-5Kpl a 5A3-5PLM bylo vidět, že křivka u 5A2 a 5A3 skupin měla pozvolnější průběh (graf č. 22 a 23). Porovnáním jsem chtěla zjistit, zda nosiče se zvlákněným A2P jej uvolňují postupněji, než kdyby byl v médiu. To bylo zjištěno nepřímo na základě metabolické aktivity buněk. Nejprve byly porovnány skupiny 5A2 a 5Kpl. Skupina 5A2 a pozitivní kontrola 5Kpl měly stejnou koncentraci A2P, v 5A2 byl zvlákněn do jádra vláken. Vidíme u skupiny 5Kpl vyšší procento maximální hodnoty absorbance zaznamenané již v den 7 oproti skupině 5A2. Ideální křivka by měla být postupně rostoucí a dosahovat 100% v den 21. Této tendenci lépe odpovídala křivka u skupiny 5A2 (graf č. 23). Podobně byla srovnána i skupina 5A3 a 5PLM. Skupina 5A3 měla stejnou koncentraci askorbátu-2-fosfátu jako skupina 5PLM, ta však měla dvojnásobnou koncentraci všech dalších suplementů. Obě skupiny však měly tyto koncentrace zvlákněné ve vláknech. Na křivce porovnávající metabolické aktivity buněk těchto dvou skupin vidíme, že křivka 5PLM měla pozvolnější tendenci (graf č. 24).



**Graf č. 23 Porovnání metabolické aktivity mezi skupinou 5A2 a 5Kpl v experimentu č. 5**

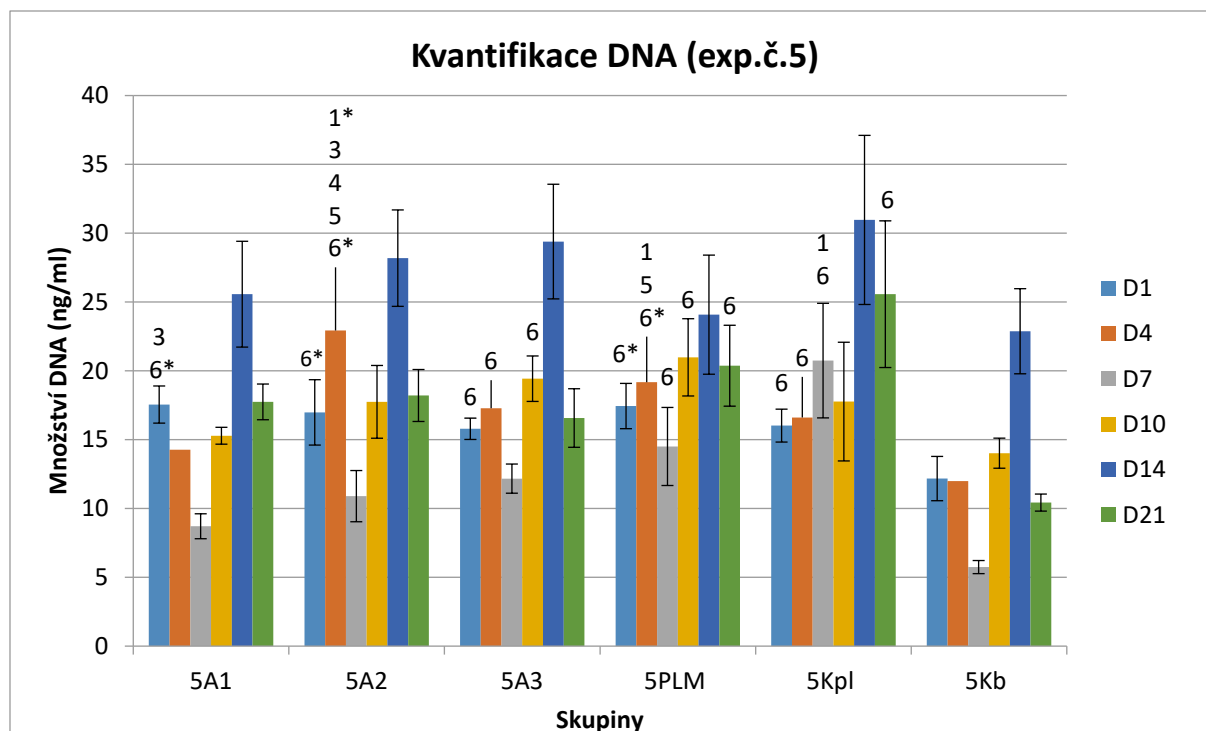


**Graf č. 24 Porovnání metabolické aktivity mezi skupinou 5A3 a 5PLM v experimentu č. 5**

### 3.4.1.2

### Kvantifikace buněčné DNA

Obsah buněčné DNA byl změřen ve dnech 1, 3, 7, 10, 14 a 21 pomocí Picogreen metody (graf č. 25).

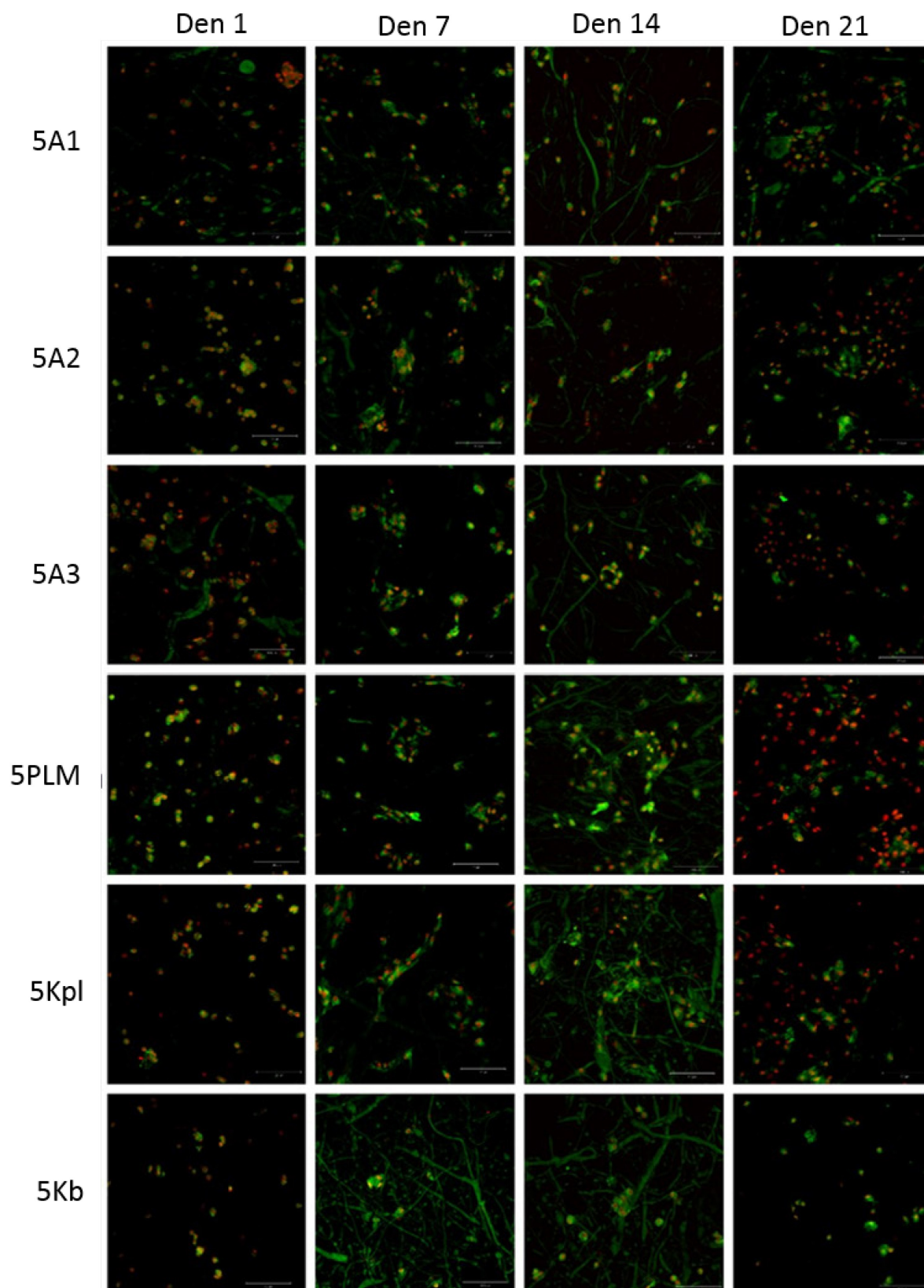


**Graf č. 25 - Množství DNA v experimentu č. 5:** A2P zvlákněn do nanovlákněného nosiče ve 4 koncentracích (skupiny 5A1-5A4) spolu s dalšími chondrogeními suplementy DEX a ITS-X. Hodnoty naměřeného množství DNA v ng/vzorek. Skupina 5PLM obsahuje zvlákněnou dvojnásobnou koncentraci chondrogenních suplementů (A2P, DEX, ITS-X). Skupina 5Kpl – pozitivní kontrola (přidáno diferenciační médium). Skupina 5Kb – negativní kontrola (přidáno růstové médium). Statisticky významné rozdíly mezi skupinami jsou značeny číslem nad sloupci (5A1=1, 5A2=2, 5A3=3, 5PLM=4, 5Kpl=5, 5Kb=6),  $p < 0,05$  a \* $p < 0,001$ .

V den 1 bylo na všech skupinách přibližně stejné množství DNA. V den 7 došlo u všech skupin, kromě kontroly 5Kpl, ke snížení obsahu buněčné DNA. Počet buněk se začal v den 10 opět zvyšovat a měl své maximum u všech skupin v den 14. V den 21 došlo u všech buněk k poklesu množství DNA. Statisticky signifikantní rozdíly byly zaznamenány již v den 1, skupina 5A1 měla rozdíly v den 1 vůči 5A3 a 5Kb. U skupiny 5A2 byl zaznamenán rozdíl v den 1 vůči 5Kb a v den 4 vůči všem ostatním skupinám. Skupina 5A3 měla rozdíl vůči skupině 5Kb 1., 4. a 10. den. U skupiny 5PLM byl statisticky významný rozdíl zaznamenán ve dnech 1, 4, 7, 10 a 21 vůči skupině 5Kb a v den 4 ještě vůči skupině 5A1 a 5Kpl. Skupina 5Kpl pak měla rozdíl vůči skupině 5Kb ve dnech 1, 4, 7 a 21 a v den 7 byl u ní zaznamenán ještě rozdíl vůči skupině 5A1.

### **3.4.1.3 Konfokální mikroskopie**

Adheze na nosič byla studována pomocí konfokální mikroskopie (viz obr. č. 30). V den 1 pozorujeme úspěšnou adhezi na nosič u všech skupin. Buňky v další dny začínají vytvářet malé shluky. Větší shluky a kolonie bylo však možno pozorovat až v den 14. Skupina 5PLM byla více porostlá buňkami než pozitivní kontrola 5Kpl.

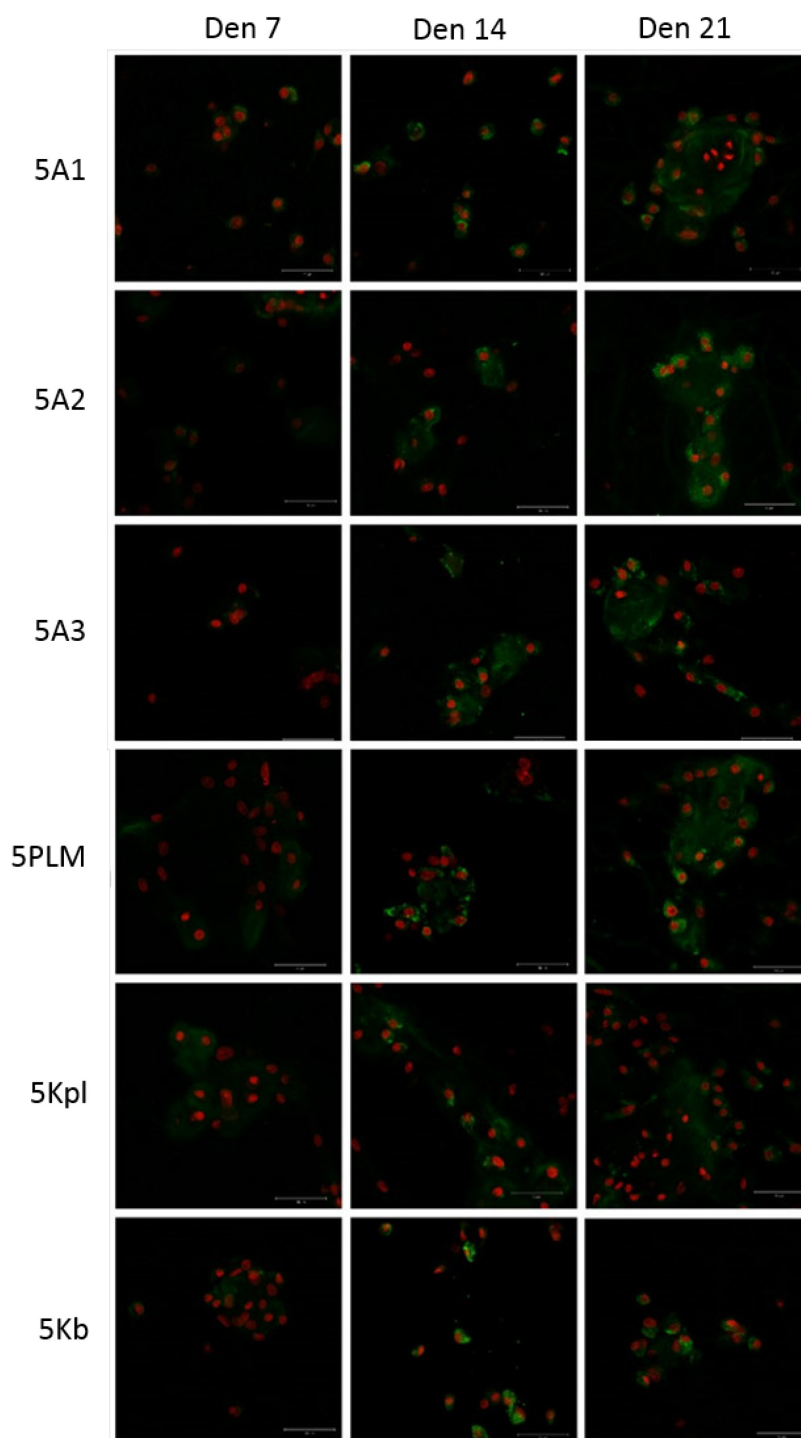


**Obr. č. 30 - Vizualizace adheze a proliferace buněk pomocí konfokální mikroskopie v experimentu č. 5:** Skupiny 5A1, 5A2, 5A3, 5PLM a kontroly 5Kpl (pozitivní) a 5Kb (negativní) pozorovány ve dnech 1, 7 14 a 21. Červeně obarvená jádra propidium jodidem a zeleně membránové struktury pomocí DiOC6(3). Měrka u všech obrázků ve velikosti 100  $\mu\text{m}$ , zvětšení 100x.

### 3.4.1.4

### Imunobarvení prokolagenu typu II

Imunobarvení prokolagenu typu II bylo pozorováno konfokálním mikroskopem a dále vyhodnoceno (viz obr. č. 31).

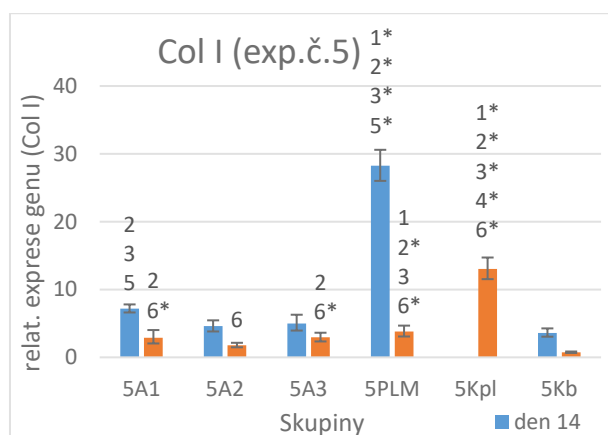


**Obr. č. 31 - Imunobarvení prokolagenu typu II v experimentu č. 5:** Prokolagen typu II detekován pomocí primární protilátky proti prokolagenu typu II a sekundární protilátky Alexa fluoro 488. Na obrázcích je zobrazen zeleně. Jádra svítí červeně po barvení propidium jodidem. Skupiny 5A1, 5A2, 5A3, 5PLM a kontroly 5Kpl (pozitivní) a 5Kb (negativní) pozorovány ve dnech 1, 7 14 a 21. Měrka u všech obrázků ve velikosti 50  $\mu\text{m}$ , zvětšení 200x.

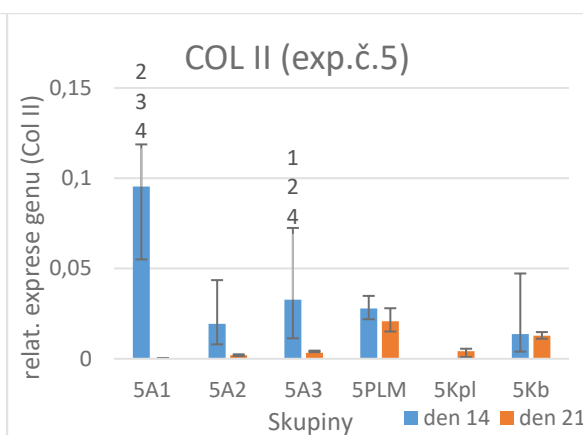
Prokolagen typu II se vytvářel v menším množství u všech skupin ve dnech 14 a 21. V porovnání s ostatními skupinami se vytvářelo nejmenší množství kolagenu typu II u skupiny PL.

### 3.4.1.5 RT-PCR

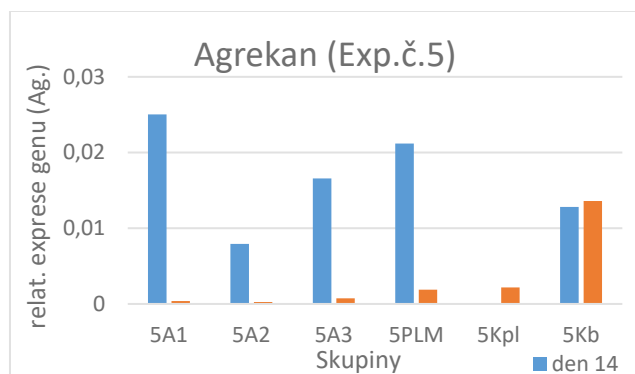
Metodou RT-PCR byla změřena exprese genů pro detekci kolagenu typu I, II a agrekanu u všech skupin v den 14 a 21 (viz graf č. 26, 27 a 28).



**Graf č. 26 - Relativní exprese genu pro kolagen I (exp. č. 5)**



**Graf č. 27 - Relativní exprese genu pro kolagen II (exp. č. 5)**



**Graf č. 28 - Relativní exprese genu pro agrekan (exp. č. 5)**

Pozn. ke grafům č. 26, 27, 28: Statisticky významné rozdíly mezi skupinami jsou značeny číslem nad sloupci (5A1=1, 5A2=2, 5A3=3, 5PLM=4, 5Kpl=5, 5Kb=6),  $p < 0,05$  a  $*p < 0,001$ .

Gen pro kolagen typu I se nejvíce exprimoval u skupiny 5PLM, u skupiny 5Kpl nevyšla v den 14 z PCR měření žádná data. Skupina 5A1 měla významný statistický rozdíl vůči skupinám 5A2, 5A3 a 5Kpl v den 14 a vůči 5A2 a 5Kb v den 21. Skupina 5A2 měla významný statistický rozdíl pouze vůči skupině 5Kb v den 21 a skupina 5A3 vůči 5A2 a 5Kb v den 21. U skupiny 5PLM byl rozdíl se statistickou významností v den 14 vůči všem

skupinám kromě skupiny 5Kb a v den 21 vůči všem skupinám kromě 5Kpl. Skupina 5Kpl měla rozdíl se statistickou významností v den 21 vůči všem ostatním skupinám.

Gen pro kolagen typu II se exprimoval v den 14 u všech skupin kromě skupiny 5Kpl, kde nám PCR metoda nevygenerovala žádná data. Statisticky významné rozdíly se objevily v den 14 u skupiny 5A1 vůči skupinám 5A2, 5A3 a 5PLM. V den 21 se gen pro kolagen II příliš neexprimoval, mírně vyšší byl u skupiny 5PLM a 5Kb. Rozdíly mezi skupinami byly bez statistické významnosti.

Gen pro agrekan se v den 14 vytvářel u všech skupin kromě 5Kpl. V den 21 se skoro nevytvářel, kromě skupiny 5Kb, a to v podobném množství jako v den 14.

### **3.4.2 Experiment č. 6 - Inkorporace dexametazonu do PCL nanovláken s dalšími suplementy a sledování jeho vlivu na adhezi, proliferaci a diferenciaci chondrocytů**

V závěrečném experimentu bylo provedeno zvláknění DEX, který nebyl zvlákněn samotný, ale společně s dalšími suplementy A2P a ITS-X pro studium jejich uvolňování a vlivu na proliferaci a diferenciaci nasazených chondrocytů. Vytvořeny byly 3 skupiny odpovídající koncentračně askorbátovým skupinám testovaných v médiu (pokus č. 3 a 4). Ke skupinám byly připojeny kontroly 6Kpl s plným chondrogenním médiem a 6Kb s médiem bez suplementů (viz tab. č. 9). Kontroly obsahovaly samotné PCL, do něhož suplementy nebyly zvlákněny. Ke skupinám byla opět použita skupina 6PLM, která obsahovala dvojnásobné množství suplementů plného chondrogenního média zvlákněné v PCL nanovlákněch. Skupina 6A2 odpovídá koncentračně skupině 6D2. Experimenty č. 5 a č. 8 byly dělány společně, pro obě skupiny jsou tedy použity stejné kontroly i skupina 6PLM. Ke skupinám 6D1-6D3 bylo přidáno médium bez suplementů.

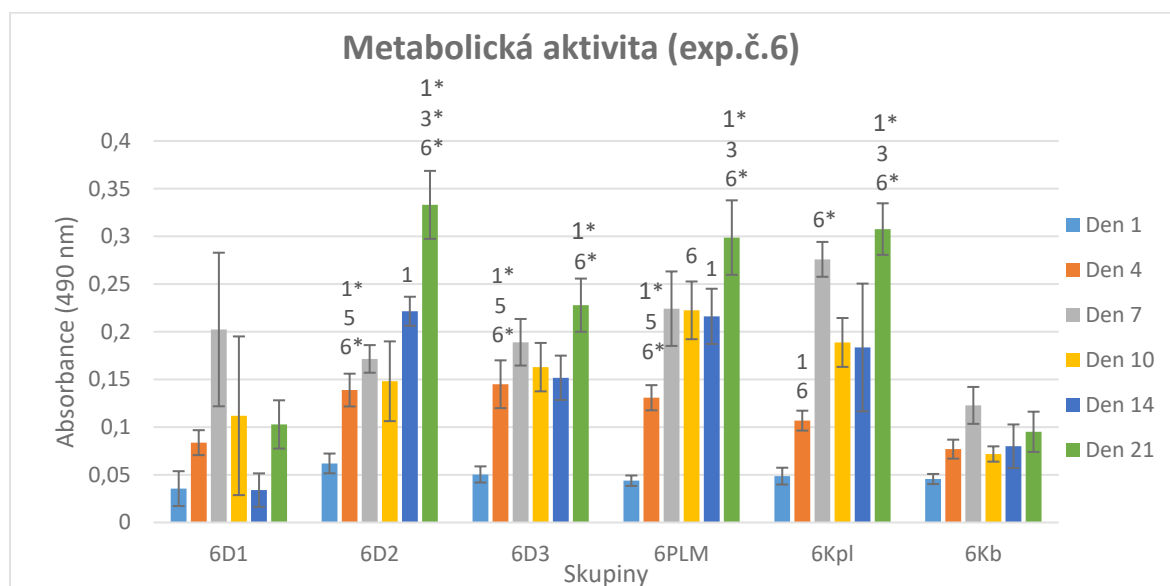


**Tabulka č. 9:** Označení skupin a koncentrací médií v pokusu č.6

Skupina	Médium	Suplement/nosič
6D1	IMDM, FBS 10%, ATB 1%, L-glutamin (400 mM)	A2P (50 µg/ml), DEX (10 nM), ITS-X (1%), zvlákněné v PCL nanovláčknech
6D2	IMDM, FBS 10%, ATB 1%, L-glutamin (400 mM)	A2P (50 µg/ml) DEX (100 nM), ITS-X (1%), zvlákněné v PCL nanovláčknech
6D3	IMDM, FBS 10%, ATB 1%, L-glutamin (400 mM)	A2P (50 µg/ml) DEX (1000 nM), ITS-X(1%), zvlákněné v PCL nanovláčknech
6PLM	IMDM, FBS 10%, ATB 1%, L-glutamin (400 mM)	A2P (100 µg/ml) DEX (200 nM), ITS-X (2%), zvlákněné v PCL nanovláčknech
6Kpl (kontrola - pozitivní)	IMDM, FBS 10%, ATB 1%, L-glutamin (400 mM), A2P (50 µg/ml), DEX (100 nM), ITS-X 1%	PCL
6Kb (kontrola - negativní)	IMDM, FBS 10%, ATB 1%, L-glutamin (400 mM)	PCL

### 3.4.2.1 MTS

V den 1, 4, 7, 10, 14 a 21 byla změřena metabolická aktivita buněk metodou MTS a zaznamenána v grafu č. 29.

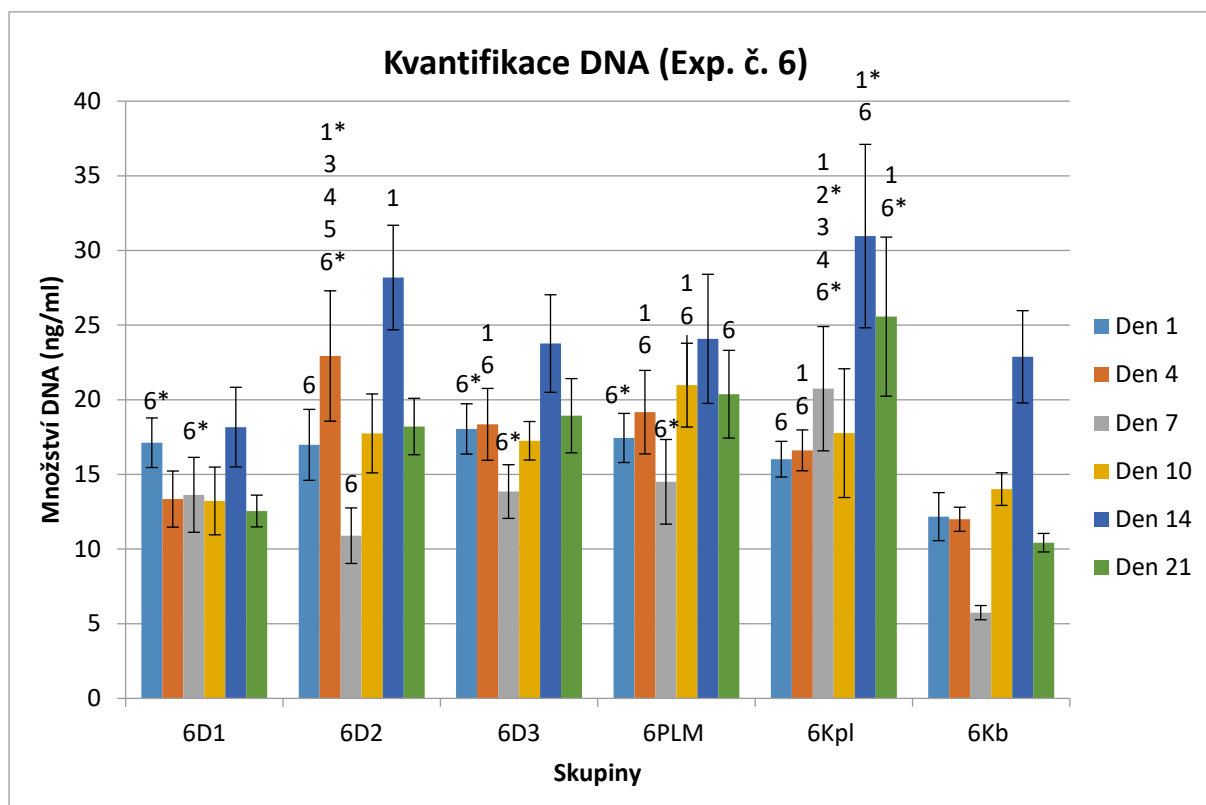


**Graf č. 29 - Metabolická aktivita buněk v experimentu č. 6:** DEX zvákněné na nanovláčkovém nosiči ve 3 koncentracích (skupiny 6D1-6D3) spolu s dalšími chondrogeními suplementy A2P a ITS-X. Skupina 6PLM obsahuje zvlákněnou dvojnásobnou koncentraci chondrogeních suplementů (A2P, DEX, ITS-X). Skupina 6Kpl – pozitivní kontrola (přidáno diferenciální médium). Skupina 6Kb – negativní kontrola (přidáno růstové médium). Naměřené hodnoty absorbance ve dnech 1, 3, 7, 10, 14 a 21 MTS testem jsou vyneseny v grafu. Statisticky významné rozdíly mezi skupinami jsou značeny číslem nad sloupci (6D1=1, 6D2=2, 6D3=3, 6PLM=4, 6Kpl=5, 6Kb=6),  $p < 0,05$  a  $*p < 0,001$ .

V den 1 byla u všech skupin naměřena přibližně stejná metabolická aktivita buněk. Během dne 4 a 7 došlo ke zvýšení metabolické aktivity buněk u všech skupin. V den 10 došlo k mírnému poklesu u všech skupin. Buňky opět zvyšovaly svou metabolickou aktivitu v den 14 a 21. Většina skupin měla své metabolické maximum v den 21, skupina 6D1 a skupina 6Kb v den 7. Nejvyšší hodnoty metabolické aktivity dosáhly skupina 6D2, 6PLM, 6Kpl 21. den. Statisticky signifikantní rozdíl byl pozorován 4. den u skupin 6D2, 6D3 vůči skupinám 6D1, 6Kpl a 6Kb. U skupiny 6PLM pouze vůči skupinám 6D1 a 6Kb. V den 7 byl významný rozdíl u skupiny 6Kpl vůči 6Kb, v den 10 u skupiny 6PLM vůči 6Kb. V den 14 byl rozdíl zaznamenán u skupin 6D2 a 6PLM vůči 6D1. V den 21 u skupin 6D2, 6PLM a 6Kpl vůči skupinám 6D1, 6D3 a 6Kb. V den 21 byl rozdíl zaznamenán ještě u skupiny 6D3 vůči skupinám 6D1 a 6Kb.

### 3.4.2.2 Kvantifikace buněčné DNA

Obsah jaderné DNA byl změřen metodou Picogreen (graf č. 30).

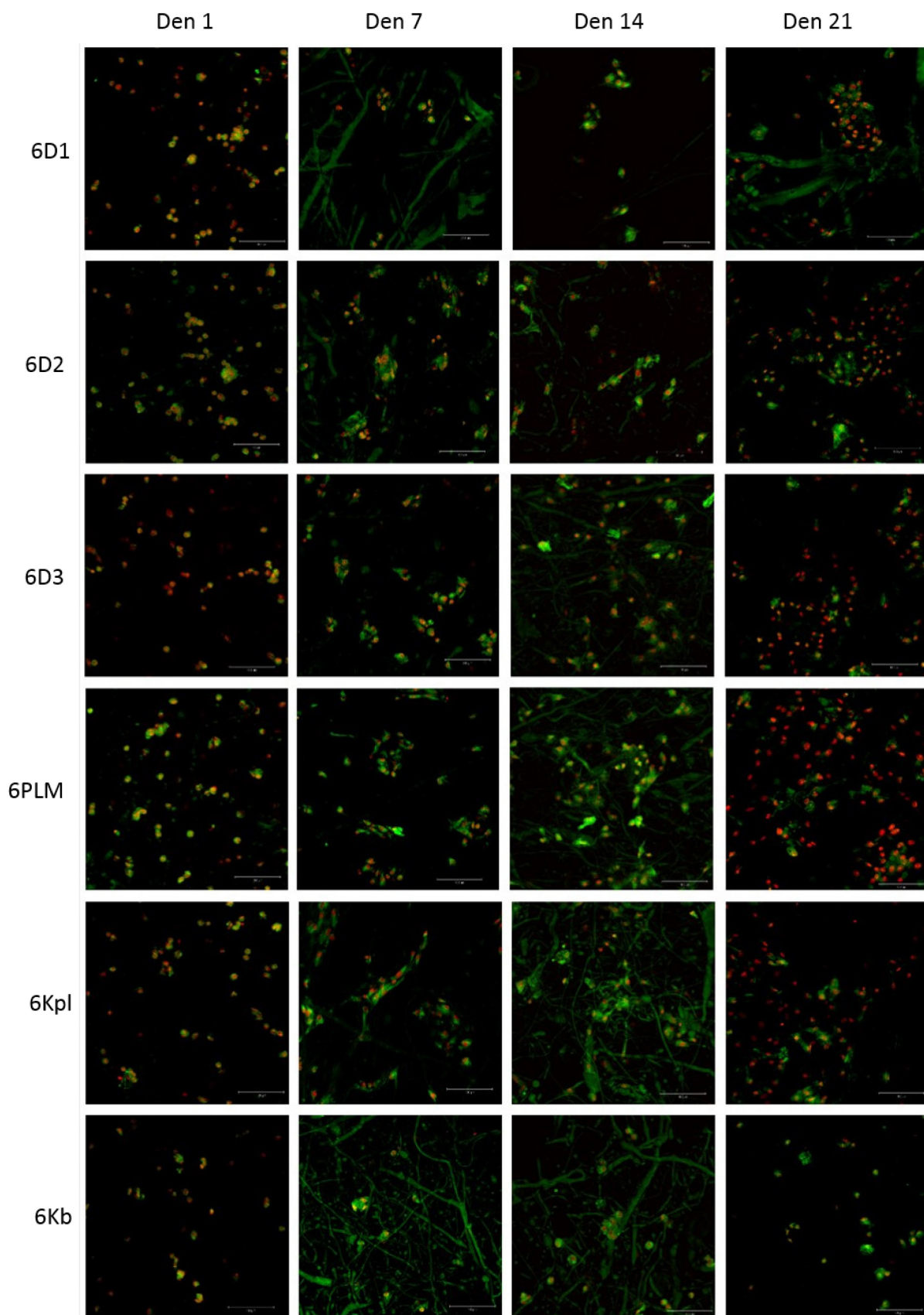


**Graf č. 30 - Množství DNA v experimentu č. 6:** DEX zvlákněn no nanovlákněného nosiče ve 3 koncentracích (skupiny 6D1, 6D2, 6D3) spolu s dalšími chondrogeními suplementy A2P a ITS-X. Hodnoty naměřeného množství DNA v ng/vzorek. Skupina 6PLM obsahuje zvlákněnou dvojnásobnou koncentraci chondrogeních suplementů (A2P, DEX, ITS-X). Skupina 6Kpl – pozitivní kontrola (přidáno diferenciační médium). Skupina 6Kb – negativní kontrola (přidáno růstové médium). Statisticky významné rozdíly mezi skupinami jsou značeny číslem nad sloupci (6D1=1, 6D2=2, 6D3=3, 6PLM=4, 6Kpl=5, 6Kb=6),  $p < 0,05$  a \* $p < 0,001$ .

V den 1 bylo množství DNA na nosičích přibližně stejné, adheroval tedy přibližně stejný počet buněk, až na skupinu 6Kb, kde bylo množství DNA o něco nižší. Množství DNA na nosičích se v prvních dnech příliš neměnilo. K poklesu došlo v den 7, kromě skupiny 6D1, kde se množství DNA neměnilo a 6Kpl, ve kterém narůstalo. Později došlo k opětovnému nárůstu obsahu DNA na nosičích. Statisticky signifikantní rozdíl byl pozorován 1. a 7. den mezi skupinami 6D1, 6D3 a 6PLM a skupinou 6Kb. V den 1 a 7 byl signifikantní rozdíl pozorován u všech skupin vůči 6Kb. U skupiny 6D2 byl navíc pozorován rozdíl v den 4 vůči všem ostatním skupinám a v den 14 vůči 6D1. Skupina 6D3 měla navíc rozdíl 4. den vůči skupinám 6D1 a 6Kb. Skupina 6PLM měla navíc rozdíl ve dnech 4, 10 a 21 vůči 6Kb a ve dnech 4 a 21 vůči 6D1. Skupina 6Kpl měla navíc rozdíl ve dnech 4, 14 a 21 vůči skupinám 6D1 a 6Kb a v den 7 vůči všem ostatním skupinám.

### **3.4.2.3 Konfokální mikroskopie**

Buněčná adheze v den 1 byla ověřena konfokální mikroskopií (obrázek č. 32).

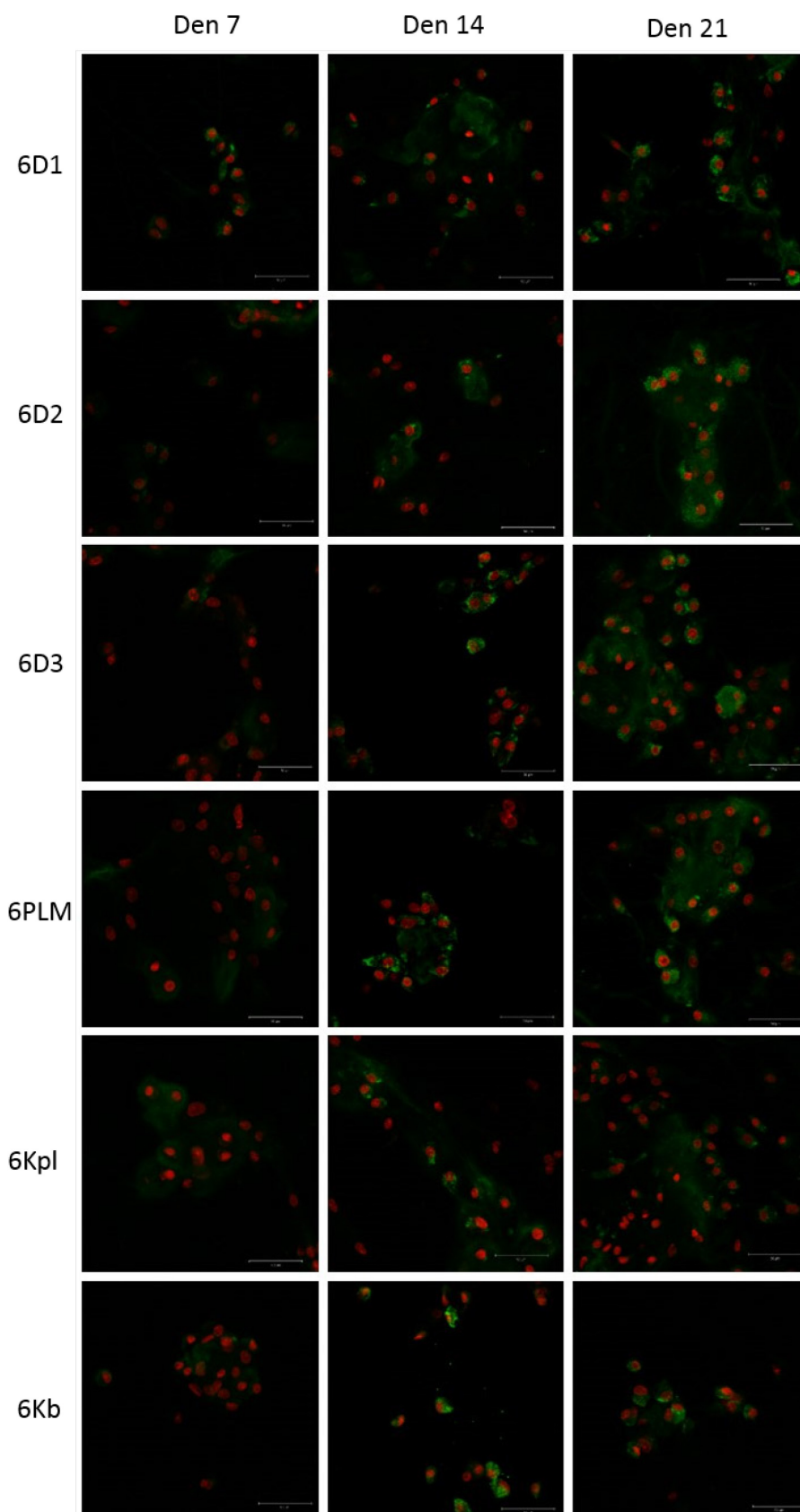


**Obr. č. 32 - Vizualizace adheze a proliferace buněk pomocí konfokální mikroskopie v experimentu č. 6:** Skupiny 6D1, 6D2, 6D3, 6PLM a kontroly 6Kpl (pozitivní) a 6Kb (negativní) pozorovány ve dnech 1, 7, 14 a 21. Červeně obarvená jádra propidium jodidem a zeleně membránové struktury pomocí DiOC6(3). Měrka u všech obrázků ve velikosti 100  $\mu\text{m}$ , zvětšení 100x.

Buněčná adheze byla podobná u všech skupin. Ode dne 7 se začaly buňky shlukovat. Nejvíce rostly na nosičích 6D3, 6PLM a 6Kpl. Již ode dne 14 jsme zde mohli pozorovat větší buněčné kolonie. Buňky zde dobře proliferovaly oproti skupinám 6D1 a 6Kb, kde byla proliferace spíše nižší.

#### **3.4.2.4 Imunobarvení prokolagenu typu II**

Byl detekován prokolagen typu II na nosičích ve dnech 7, 14 a 21 (obrázek č. 33).

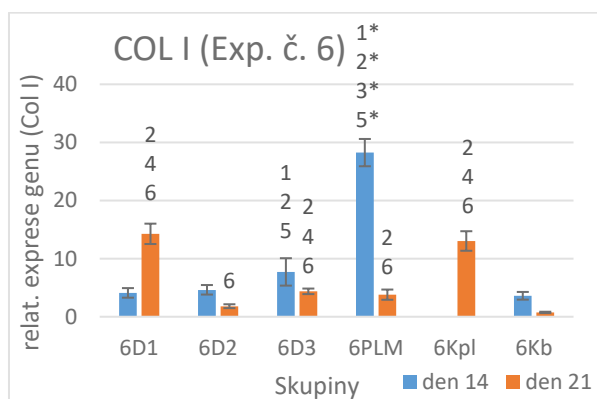


**Obr. č. 33 - Imunobarvení prokolagenu typu II v experimentu č. 6:** Prokolagen typu II detekován pomocí primární protilátky proti prokolagenu typu II a sekundární protilátky Alexa fluor 488. Na obrázcích je zobrazen zeleně. Jádra svítí červeně po barvení propidium jodidem. Skupiny 6D1, 6D2, 6D3, 6PLM a kontroly 6Kpl (pozitivní) a 6Kb (negativní) pozorovány ve dnech 1, 7, 14 a 21. Měrka u všech obrázků ve velikosti 50  $\mu\text{m}$ , zvětšení 200x.

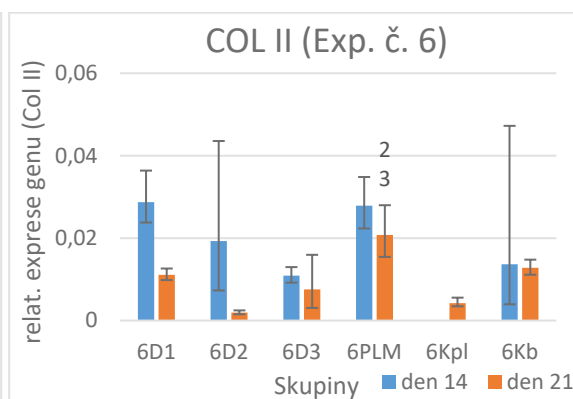
Prokolagen typu II byl v malém množství pozorovatelný ve dnech 14 a 21 na všech skupinách. Nejméně prokolagenu typu II bylo pozorováno u skupiny 6Kpl.

### 3.4.2.5 RT-PCR

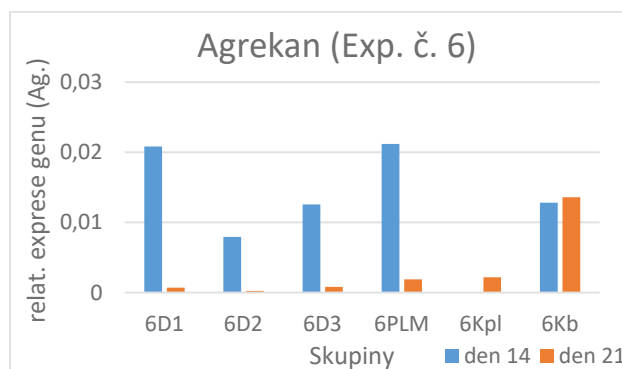
Expresse genu pro kolagen typu I, II a agrekan byla ověřen metodou RT-PCR ve dnech 14 a 21 (viz grafy č. 31, 32 a 33).



**Graf č. 31 - Relativní exprese genu pro kolagen typu I (exp. č. 6)**



**Graf č. 32 - Relativní exprese genu pro kolagen typu II (exp. č. 6)**



**Graf č. 33 - Relativní exprese genu pro agrekan (exp. č. 6)**

Pozn. ke grafům č. 31, 32 a 33: Statisticky významné rozdíly mezi skupinami jsou značeny číslem nad sloupci (6D1=1, 6D2=2, 6D3=3, 6PLM=4, 6Kpl=5, 6Kb=6),  $p < 0,05$  a \* $p < 0,001$ .

Gen pro kolagen typu I se exprimoval ve dni 14 podobně u skupiny 6D1-6D3 a kontroly 6Kb. Statisticky signifikantní rozdíl byl v den 14 u skupiny 6D3 vůči 6D1, 6D2 a 6Kb. Nejvíce se gen kolagen typu I pro exprimoval u skupiny 6PLM, zde byl rozdíl vůči skupinám 6D1-6D3 a 6Kpl statisticky významný. U skupiny Kpl nevyšla na PCR v den 14 žádná hodnota. V den 21 byla naměřena vyšší exprese u skupin 6D1 a 6Kpl. Byly pozorovány statisticky významné rozdíly u všech skupin vůči 6Kb, dále u skupin 6D1, 6D3 a 6Kpl vůči 6PLM a u skupin 6D1, 6D3, 6PLM a 6Kpl vůči 6D2.

Gen pro kolagen typu II se kromě skupiny 6Kpl, u které nevyšla v den 14 na PCR žádná hodnota, exprimoval ve všech skupinách. Byly tu zvláště v den 14 patrné vyšší směrodatné odchylky. V den 21 se nejvíce exprimoval u skupiny 6PLM, u které byl statisticky významný rozdíl vůči skupině 6D2 a 6D3.

Gen pro agrekan byl exprimován, kromě skupiny 6Kpl, ve všech skupinách ve dni 14. V den 21 byla exprese výrazně snížena až na skupinu 6Kb, u které byla exprese na stejné úrovni jako ve dni 14.

#### 4. DISKUZE

Jedním z cílů tkáňového inženýrství je zajištění růstu a diferenciaci buněk na různých typech biomateriálů. Ty buňkám poskytují mechanickou oporu. Navíc mohou obsahovat látky zajišťující jejich diferenciaci do správné buněčné linie a to možná co nejefektivněji pro navození původní funkce tkáně v kratším čase hojení. V případě tkáňového inženýrství chrupavky se jedná o navození chondrogenní diferenciaci mezenchymálních kmenových buněk a udržení diferencovaných primárních chondrocytů.

Shin a kol. pozoroval, že chondrocyty mají tendenci dediferencovat, pokud se nachází v monovrstvě při kultivaci v 2D prostředí, např. na kultivačním plastu. Exprimují více genů typických pro hypertrofické chondrocyty jako Col10a1, RUNX2, MMP3, ALP aj. Jejich fenotyp se mění na fibroblastový s rostoucím počtem pasáží (Shin et al. 2016). To bylo pozorováno i v mém experimentu, kde byly primární chondrocyty izolované z chrupavky prasete kultivovány v růstovém a diferenciačním médiu. Buňky začaly ztrácet svůj fenotyp, který se mezi 4. -7. dnem přeměňoval na fibroblastový (viz obr. č. 18 a 19). RT-PCR analýza ukázala, že došlo k nárůstu exprese genu chondrogenního markeru agrekanu v 1. pasáži (P1) u buněk kultivovaných v diferenciačním médiu (viz graf č. 1) a k poklesu exprese u 2. a 3. pasáže (P2 a P3). Nárůst exprese genu pro agrekan v 1. pasáži je nejspíše způsobeno přidáním A2P v médiu, neboť kyselina askorbová zvyšuje jeho syntézu (Clark et al. 2002). S přibývajícemi pasážemi byla jeho exprese snížena (P2 a P3). Exprese agrekanu u jiné studie chondrocytů v monovrstvě zůstala nezměněna během pasáže 2 a 4, avšak výrazně se snížila v pasáži 6. Mimo agrekan se během kultivace v monovrstvě snížila i exprese kolagenu typu II, exprese kolagenu typu I zůstala nezměněna mezi 2. a 6. pasáží (Lin et al. 2008).

Pro navození chondrogenní diferenciaci *in vitro* se do kultivačního média přidávají chondrogenní suplementy, jako A2P, DEX či ITS-X (Cigan et al. 2013) a dále např. růstové faktory (TGFβ-1, TGFβ-2, TGFβ-3, IGF-1, FGF, BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, BMP-9)



či jiné molekuly (glukóza, hydrokortizon, prolin, thyroxin, pyruvát aj.). Média mívají definované složení s danými koncentracemi jednotlivých suplementů. (Puetzer, Petite, and Lobo 2010)

V této práci byly zkoumány molekuly A2P a DEX, které byly v médiu přidány k primárním prasečím chondrocytům v koncentraci několikanásobně vyšší či nižší oproti koncentraci standardně užívané v diferenciacním médiu. Standardní diferenciacní médium bylo použito jako pozitivní kontrola a jako negativní kontrola médium růstové – tedy médium bez přidáných chondrogenních suplementů. Cílem použití diferenciacního média je podnícení signalizace, která vede k chondrogenní diferenciaci. Dochází k vzniku chondrocytárního fenotypu demonstrovaného přítomností intracelulárních markerů i produkci specifické ECM. Typickým markerem chondrogenní diferenciacce je produkce kolagenu typu II a nižší produkce kolagenu typu I (Mardani et al. 2013).

Diferenciacní médium se pro účely tkáňového inženýrství chrupavky přidává k MSC a k primárním chondrocytům, což jsou chondrocyty v rané fázi chondrogenese. U MSC původem z kostní dřeně se často jako základ do média přidává A2P, DEX a TGF- $\beta$ . Zároveň mohou být média doplněna o různou kombinaci dalších růstových faktorů. Bylo přidáno např. IGF (Matsuda et al. 2005), ITS spolu s BMP-6 (Fernandes et al. 2010; Diekman et al. 2010). Dále bývá používán BSA v kombinaci s ITS (Vogel et al. 2006). Kromě významu signálních molekul, jsou v tkáňovém inženýrství důležité i topologické stimuly indukované nosičem - typicky biomateriálem (Ricci et al. 2016). Tvrdší povrch nosiče např. stimuloval MSC do osteogenní diferenciacce, povrch měkčí stimuluje diferenciaci lipofilní (C. Huang, Dai, and Zhang 2015).

MSC i chondrocyty byly kultivovány na mnoha typech biomateriálů pro navození 3D prostředí, např. na bázi proteinů, jako jsou kolagen (Cherubino et al. 2003; Kuroda et al. 2007) či fibrin (Hendrickson et al. 1994; Dragoo et al. 2007) či na bázi polysacharidů jako alginát (Selmi et al. 2008; Awad et al. 2004), chitosan (Hoemann et al. 2007), HA (Marcacci et al. 2005; Kayakabe et al. 2006), celulóza (C. Vinatier et al. 2007), či na syntetické matici typu PLGA (Munirah et al. 2008), PLA (J. Chen et al. 2005) či PEG (Nicodemus, Villanueva, and Bryant 2007; Terraciano et al. 2007).

Chondrocyty kultivované v 3D prostředí, např. alginátových kapek či v peletách exprimovaly geny pro chondrogenní mRNA jako kolagen typu II, SOX9 či agrekan (Caron et al. 2012). Kromě možnosti dediferenciacce chondrocyty obecně i příliš neproliferují a mají

nízkou produkci chrupavčité ECM (J.-L. Chen et al. 2014). Oblast tkáňového inženýrství se snaží vytvořit chondrogenní konstrukt, který by navozoval účinnou chondrální diferenciaci pomocí 3D prostředí a chondrogenních biomolekul.

Chondrocyty byly kultivované i na PCL nosiči připraveném elektrostatickým zvlákňováním (Buzgo et al. 2013, Mickova et al. 2012, Jakubova et al. 2012). Touto metodou se však nedá vytvořit taková 3D morfologie nosiče, která by se strukturně blížila ECM v chrupavce. PCL nosiče se proto kombinují např. s hydrogely (Eyrich et al. 2007). V této práci byly připraveny PCL nosiče metodou centrifugačního zvlákňování, procesem, který umožňuje tvorbu „nadýchanějších“ 3D PCL nosičů.

V této práci obsahovalo kultivační médium různé koncentrace A2P a DEX a bylo přidáváno k buňkám kultivovaným na PCL vlákenném nosiči připraveném odstředivým zvlákňováním. Koncentrace byly zvoleny na základě publikací testujících koncentraci chondrogenních suplementů v médiu (Vater, Kasten, and Stiehler 2011). Byl studován vliv samotných suplementů A2P (pokus č. 1) a DEX (pokus č. 3) na metabolickou aktivitu, proliferaci a expresi genů pro kolagen typu II, typu I a agrekan a to v různých koncentracích obou suplementů. V pokusech č. 2 a č. 4 byly A2P (pokus č. 2) a DEX (pokus č. 4) obsaženy v médiu v dané koncentraci jako v pokusech č. 1 a č. 3, avšak v kombinaci s dalšími chondrogenními suplementy (A2P respektive DEX a ITS-X). Byl zde zkoumán vliv suplementu na metabolickou aktivitu, proliferaci a expresi genů chondrocytů, pokud je suplement ovlivňován i dalšími chondrogenními suplementy. Bylo pozorováno, zda se jeho účinek v kombinaci s dalšími faktory zesiluje či zeslabuje. V pokusech č. 5 a č. 6 byly látky A2P a DEX uzavřeny do jádra nanovláken během procesu zvlákňování. Byl studován vliv uvolňujících se A2P/DEX z vláken na diferenciaci kultivovaných chondrocytů na vláknech. Buňky byly na nosičích kultivovány po dobu 21 dní, což je standardní doba pro navození chondrogenese na nanovlákném nosiči.

Diskuze je pro přehlednost a lepší orientaci čtenářů členěná dle experimentů a diskutuje poznatky získané v jednotlivých experimentech.

#### **Pokus č. 1 – L-askorbát-2-fosfát samostatný v médiu**

V pokusu č. 1 jsem testovala vliv vzrůstající koncentrace A2P na metabolickou aktivitu, proliferaci a expresi genů pro kolagen typu II, typu I a agrekan primárních prasečích chondrocytů nasazených na PCL nanovlákném nosiči. Dle zjištění vzrůstala metabolická aktivita chondrocytů na nanovlákných nosičích, především v den 21, kdy byla srovnatelná

s metabolickou aktivitou pozitivní kontroly 1Kpl. Buňky negativní kontroly 1Kb (médium bez přidaných chondrogenních suplementů) měly podle očekávání velice nízkou metabolickou aktivitu. To vysvětluje důležitost A2P pro zvýšení metabolické aktivity chondrocytů. Vysvětlení efektu je zejména ve zvýšení biosyntézy kolagenu díky působení A2P. A2P má vliv na hydroxylační reakce, kromě tvorby vitamínu D je důležitý především pro hydroxylaci prolinových a lysinových zbytků v prokolagenu, stimuluje jeho sekreci modulací hydroxylace. Hydroxyprolin je důležitý pro stabilizaci triple helixu kolagenu a hydroxylysin pro tvorbu mezimolekulárních křížových vazeb. (Murad et al. 1981; Peterkofsky 1991b; Layman, Sokoloff, and Miller 1972).

Oproti negativní kontrole 1Kb chondrocyty proliferovaly lépe na skupinách obsahujících A2P. To znamená, že samotný A2P by měl mít význam pro proliferaci chondrocytů, což koreluje s dalšími studiemi. Po přidání 30-50 $\mu$ M askorbové kyseliny do bezsérového média vzorstla např. u studie Venezian a kol. proliferace chondrocytů 4-5x (Venezian et al. 1998). Zajímavým je i srovnání s diferenciačním médiem (1Kpl – pozitivní kontrola), na kterém došlo k dalšímu zvýšení proliferativního účinku oproti skupinám 1A1-1A4, což by mohlo být způsobeno přítomností dalších chondrogenních suplementů DEX a ITS-X.

Výsledky metabolických esejí korelují s mikroskopickou analýzou. Dle výsledků konfokální a SEM mikroskopie jsem pozorovala, že buňky úspěšně adherovaly na PCL nanovláknenný nosič. PCL nanovláknena se jeví být vhodným materiálem i pro další pokusy, jelikož umožňují adhezi a proliferaci primárních chondrocytů, jejich rediferenciaci a syntézu markerů chondrogenní ECM (Garcia-Giralt et al. 2008b). V pokusu č. 1 bylo na SEM vidět, že chondrocyty u skupiny 1Kpl ztrácí už v 7. den svůj zakulacený tvar (viz obr. č. 21) a začíná se objevovat fibroblastová morfologie. Pomocí konfokální mikroskopie bylo vidět, že chondrocyty na této skupině dobře proliferují a dosahují konfluence na některých vzorcích už 14. den. U askorbátových skupin byly patrné spíše shluky, buňky zde proliferovaly méně, než u skupiny 1Kpl. Tvorba shluků a kulovitá morfologie je typická pro chondrocyty *in vivo*. Díky tomu usuzuji, že kultivační protokol napomáhal lepšímu udržení chondrogenního fenotypu buněk.

Z fenotypového pohledu jsem se zaměřila na testování expresního profilu markerových genů pro kolagen typu I a II a agrekan. U grafů pro agrekan však nemohla být zjištěna statistická významnost oproti jiným skupinám, neboť byla izolována RNA pouze z dupletu vzorků, u vzorků pro kolagen I a II byly v tripletech a bylo možné u nich zjistit

statisticky významné rozdíly mezi skupinami (platí i u následujících pokusů). Kolagen typu I byl exprimován zejména u skupiny 1Kpl (viz graf č. 4). U vzorků s askorbátem byla exprese kolagenu typu I výrazně nižší. Expresce nejevila známky závislosti na koncentraci askorbátu. U studií osteoblastických buněčných linií však zvyšoval askorbát expresi kolagenu typu I (Franceschi and Iyer 2009). Obdobně, v případě kolagenu II a agrekanu byla nejvyšší exprese zaznamenána u skupiny 1Kpl (viz graf č. 5). Výsledky ukazují, že A2P samotný nemá zřejmě významný efekt na expresi markerů chondrogenní diferenciace.

Zdá se, že A2P obsažen samotný v médiu, bez dalších chondrogenních suplementů zvyšoval metabolickou aktivitu chondrocytů, podněcoval mírnou chondrogenní diferenciaci expresí genu pro kolagen typu II, efekt je však nižší, než u 1Kpl. Stimulace syntézy kolagenu typu II a agrekanu byla potvrzena u kyseliny askorbové (Clark et al. 2002) a jejích derivátů (Ibold et al. 2009). Ve studii osteoblastové buněčné linie vzrůstala spolu se zvyšující se koncentrací askorbátu i indukce hydroxyprolinu (Franceschi and Iyer 2009).

#### **Pokus č. 2 – L-askorbát-2-fosfát spolu s dalšími suplementy v médiu**

V dalším experimentu jsem se zaměřila na efekt A2P s přidávanými chondrogenními suplementy DEX a ITS-X v médiu. Pozitivní kontrola 2Kpl odpovídá skupině 2A2 a obsahuje opět chondrogenní diferenciační médium. Skupina 2A1 obsahovala 2x nižší koncentraci A2P než 2Kpl. Skupiny 2A3 a 2A4 obsahovaly vyšší koncentrace (2x- 2A3, 4x – 2A4) než 2Kpl. Skupina 2A0 neobsahuje A2P, avšak obsahuje DEX a ITS-X. Výsledky ukázaly, že nejvíce metabolicky aktivní byla skupina 2A4, kde byla naměřena v den 21 statisticky nejvyšší metabolická aktivita vůči všem ostatním skupinám.

Adheze chondrocytů na nosič byla vizualizována pomocí konfokální mikroskopie (viz obr. č. 23). Zvýšení metabolické aktivity spolu se zvýšením koncentrace A2P v médiu je způsobeno nejspíše vyšší biosyntézou kolagenu. U skupiny 2A0 bez askorbátu byla metabolická aktivita podobná negativní kontrole 2Kb s růstovým médiem. Askorbát a jeho deriváty jsou tedy důležité pro zvýšení metabolické aktivity chondrocytů, A2P v kombinaci s dalšími suplementy (DEX a ITS-X) vedlo k signifikantně vyšší metabolické aktivitě než bez nich. A2P má tedy nejspíše v diferenciačním médiu synergický efekt s DEX a ITS. Pokud působí sám, podněcuje zvýšení metabolické aktivity (viz předchozí pokus č. 1), avšak skupiny se samotným A2P z minulého pokusu měly vůči skupině 1Kpl sníženou proliferaci a expresi genů pro chondrogenní markery kolagen II a agrekan. V médiu jsou tedy potřeba i další složky kromě A2P, jeho osamocené působení neinicuje chondrogenézi jako kombinace

s dalšími složkami. Při kultivaci chondrocytů na hydrogelech samotný askorbát indukoval expresi genu pro kolagen typu II, při přidání DEX byla tato exprese ještě zvýšena (Na et al. 2006).

Rovněž je zde patrné, že A2P má vliv na proliferaci chondrocytů, demonstrovanou zvýšením koncentrace DNA 21. den po nasazení. Skupiny 2A1-2A4 obsahující koncentrace A2P 50 µg/ml - 200 µg/ml vykazovaly stejnou míru proliferace jako pozitivní kontrola kultivovaná v plném diferenciacním médiu (2A2).

U tohoto pokusu byla rovněž zařazena skupina 2A0 (bez A2P, ale s dalšími suplementy ITS-X a DEX), která se blížila metabolickou aktivitou negativní kontrole 2Kb. Hodnoty exprese genů pro kolagen typu I a II byly obecně vyšší, než v předchozím pokusu. Na rozdíl od proliferace, kde skupiny 2A1-2A4 rostly lépe oproti kontrolám 2Kb a skupině 2A0.

Zlepšení proliferace a exprese markrových molekul může být způsobeno zlepšenou biosyntézou a maturací ECM. Maturace ECM je důležitým signálem pro růst chondrocytů. Při diferenciaci chondrocytů jsou pozorovány chondrogenní markery – především exprese a depozice kolagenu typu II, agrekanu či sulfatovaných proteoglykanů (Mauck, Yuan, and Tuan 2006; Prante et al. 2006; Liao 2011).

### **Pokus č. 3 – Dexametazon samotný v médiu**

Při zkoumání efektu suplementů chondrogenního média, jsem se dále zaměřila na efekt samotného DEX, jako součásti standardního diferenciacního média. Růstové médium s DEX bylo srovnáno s chondrogenním diferenciacním médiem (3Kpl). Metabolická aktivita chondrocytů byla u DEX skupin snížena a podobá se hodnotě negativní kontroly 3Kb. Samotný DEX v médiu tedy zjevně neovlivnil zvýšení metabolické aktivity. Skupina 3Kpl rovněž nejlépe proliferovala (graf č. 13). Dle výsledků testů metabolické aktivity a proliferace, měl DEX obecně na chondrocyty spíše inhibiční efekt. Výsledky korelují s poznatky jiné studie na modelu prasečích chondrocytů (Smink et al. 2002). U hMSC v jiné studii DEX mírně podpořil proliferaci (Nguyen et al. 2012). V proliferujících chondrocytech u jiných studií byla pozorována indukce apoptózy pomocí DEX (Dionisios Chrysis et al. 2005; D Chrysis, Ritzen, and Säwendahl 2003; Hossain et al. 2008), konkrétně aktivací kaspázy 8 a supresí signalizační kaskády antiapoptotické fosfatidylinositol 3'kinázy (PI3K) (Dionisios Chrysis et al. 2005).

Mé výsledky ukazují, že DEX má pozitivní efekt na expresi chondrogenních markerů kolagenu II a agrekanu (viz grafy č. 15, 16), což korelovalo i s jinou studií (Florine et al. 2013). I v další studii bylo potvrzeno, že DEX hraje zásadní roli v chondrogenези MSC. DEX obsažený v kultivačním médiu zvyšoval expresi agrekanu, dermatopontinu a kolagenu typu 9 (Derfoul et al. 2006). U ATDC5 buněčné linie však DEX inhibuje chondrogenní diferenciaci podregulací Wnt/ $\beta$ -catenin signalizace (Naito, Ohashi, and Takahashi 2015b). U skupiny 3D3 došlo k zvýšení exprese kolagenu II a agrekanu na úroveň kontrolní skupiny 3Kpl (kolagen II) či vyšší (agrekan). Při studiu mesenchymálních progenitorových buněk zvyšoval DEX spolu s lidským rekombinantním TGF- $\beta$ 1 expresi Sox9. V kombinaci DEX/ TGF- $\beta$ 1 s kolagenem typu II byla zvýšena exprese agrekanu, v kombinaci s kolagenem I byla exprese snížena. U těchto buněk byla pomocí zmíněných suplementů navozena chondrogenní diferenciaci (C. W. Chen et al. 2005). DEX v jiné studii redukoval činnost agrekanázy – enzymu zodpovědného za lýzu agrekanu, syntéza agrekanu byla zvýšena (Florine et al. 2013).

Samotný DEX v médiu tedy příliš nezvyšoval metabolickou aktivitu a proliferaci buněk, ale udržoval expresi chondrogenních markerů kolagenu typu II a agrekanu.

#### **Pokus č. 4 – Dexametazon v kombinaci s dalšími suplementy v médiu**

Různé koncentrace DEX byly otestovány v pokusu č. 4, kde byl kombinován s ostatními složkami chondrogenního média – A2P a ITS-X. Skupina 4D2 zde odpovídala 4Kpl s použitým chondrogenním diferenciacním médiem. Skupina 4D1 obsahovala 10x nižší koncentraci DEX než 4Kpl, sk. 4D3 10x vyšší koncentraci DEX než 4Kpl (viz tab. č. 7). Sk. 4D0 neobsahovala DEX, ale obsahovala A2P a ITS-X.

Adheze na nosič byla vizualizována pomocí konfokální mikroskopie (obr. č. 28). Na grafu metabolické aktivity (graf č. 17) lze vidět, že hodnoty metabolické aktivity byly nižší a dosahovaly podobných hodnot napříč skupinami, byly však poměrově vyšší oproti hodnotám metabolické aktivity v pokusu č. 3 (graf č. 12). Skupiny proliferovaly podobně.

Expresí genu pro kolagen typu I byla zvýšená u skupin 4D2=4Kpl a 4D3, které měly statisticky významný rozdíl vůči skupinám 4D0 a 4D1 (graf č. 19). U exprese genu pro kolagen typu II byla exprese nižší u 4D3 (graf č. 20). U exprese genu pro agrekan pozorujeme snížený trend u sk. 4D0 (graf č. 21). Výsledky ukazují na vyšší expresi genů pro kolagen typu I u nižších koncentrací DEX.

V tomto pokusu nebyl pozorován takový inhibiční efekt DEX na buněčnou metabolickou aktivitu a proliferaci jako u pokusu č. 3. Samotný DEX v médiu tedy inhibuje růst a metabolickou aktivitu chondrocytů, v kombinaci s dalšími faktory (A2P, ITS-X) je tato inhibice snížena.

#### **Pokus č. 5 – L-askorbát-2-fosfát uzavřený ve vláknech**

Kromě kultivačních strategií v podmínkách *in vitro* je důležitá tvorba systémů pro stimulaci diferenciaci a proliferaci chondrocytů *in situ*. Z tohoto důvodu byl centrifugačním zvlákňováním připraven nový soubor nosičů. Technologie centrifugačního zvlákňování je na poli tkáňového inženýrství novou metodou (Vera et al. 2018; Buzgo et al. 2017).

Pro lepší kontrolu dávkování účinných látek se hledají nové biokompatibilní a biodegradabilní materiály (Matson et al. 2012). V případě malých molekul typu léků byla inkorporace a uvolňování studováno u nanovláken, kopolymeru gelů s nanovláknem (M. S. Kim et al. 2006), nanovláknenných kopolymerů (Rubert et al. 2014) polymerních peletů (HAINSWORTH et al. 1996) polymerních mikrosfér (Zolnik and Burgess 2008; Hickey et al. 2002) či kompozitů mikrosfér s gely (Patil, Papadimitrakopoulos, and Burgess 2007).

Nosiče pro uvolňování malých molekul se studují v prostředí *in vitro* (Rubert et al. 2014) či *in vivo* (M. S. Kim et al. 2006; Patil, Papadimitrakopoulos, and Burgess 2007). Zajímavou metodou je tvorba nosiče v prostředí *in situ*, např. tvorba hydrogelu v místě rány, ze kterého se uvolňoval DEX (M. S. Kim et al. 2006).

A2P byl v uvolňovacích studiích pozorován při indukci osteogenní diferenciaci (H. Kim, Kim, and Suh 2003). Postupné uvolňování A2P bylo v u PLGA nosiče pozorováno i po dobu 1 měsíce (H. Kim, Kim, and Suh 2003) či 3 měsíců (H. Kim et al. 2005).

Zhao a kol. porovnával ve své studii uvolňování askorbátu-2-fosfátu ze směsných, emulzních a koaxiálních PCL nanovláken připravených metodou elektrostatického zvlákňování. Trvalé uvolňování ASP ~20  $\mu$ M/den bylo pozorováno po dobu 2 týdnů u směsných a emulzních vláken, u koaxiálních bylo pozorováno velké počáteční uvolnění v prvních 24h (Zhao et al. 2014).

V tomto pokusu byly zvlákněny 3 vybrané koncentrace A2P do PCL nanovláken (sk. 5A1, 5A2, 5A3) v kontextu dalších suplementů DEX a ITS-X (koncentrace skupin z pokusu č. 2 uzavřené v PCL vláknech). Přidána byla skupina 5PLM, která obsahovala dvojnásobné

množství všech chondrogenních komplementů, než v 5Kpl (100 µg/ml A2P, 200 nM DEX, 2% ITS-X). V této skupině byly látky opět zvlákněny oproti kontrolám 5Kpl a 5Kb, kde byly chondrocyty kultivovány na nanovlákněch ze samotného PCL a suplementy byly přidávány do kultivačního média.

Chondrocyty u skupin 5A1-5A3 měly podobný trend metabolické aktivity, jako když byly přidány *in vitro* do média. Skupiny 5A2 a 5Kpl a skupiny 5A3 a 5PLM byly ekvivalentní, co se týče koncentrace A2P. Rozdíl byl ten, že u skupin 5A2 byla tato koncentrace zvlákněna, kdežto u 5Kpl se nacházela v médiu. Hodnoty metabolické aktivity u skupiny 5A2, 5A3, 5PLM a 5Kpl byly stejně vysoké, u skupin 5A1 a 5Kb byla snížena. Tyto 4 skupiny více podporovaly metabolickou aktivitu chondrocytů. Při porovnání metabolických aktivit u 5A2 a 5A3 skupin je patrné, že metabolická aktivita měla pozvolnější průběh než u skupiny 5Kpl, kde metabolická aktivita dosahovala maxima již v 7. den, ideálně by křivka měla mít postupně rostoucí trend a dosahovat maxima v den 21. Tomu se více blížila 5A2 v porovnání s 5Kpl. Je tedy patrné, že A2P se z vláken uvolňoval a nacházel se v médiu v podobné koncentraci, jako kdyby do něj byl přidán rovnou v médiu. Na křivce lze také pozorovat vzestupný trend a dá se tedy uvažovat o tom, že docházelo k postupnému uvolňování A2P z vláken. Postupné uvolňování A2P a DEX z PCL nanovláken vytvořených centrifugačním zvlákněním bylo pozorováno i v jiné studii z naší laboratoře (Vera et al. 2018).

RT-PCR metoda byla v tomto pokusu udělána v den 14 a 21. Gen pro kolagen typu I se v den 14 nejvíce exprimoval u skupiny 5PLM. U skupiny 5PLM je zajímavý pokles exprese kolagenu I mezi 14. a 21. dnem. Současně hodnota exprese kolagenu typu II byla u skupiny podobná 5PLM v oba sledované dny, kdežto u ostatních skupin se snižovala. Výsledek ukazuje na ideální expresní vzor u chondrocytů u skupiny 5PLM.

Výsledky ukazují, že skupina 5PLM by byla nejvhodnější pro *in situ* diferenciaci chondrocytů a je nadějná pro pozdější testování a aplikaci v tkáňovém inženýrství chrupavky.

#### **Pokus č. 6 – Dexametazon uzavřený ve vláknech**

DEX byl v uvolňovacích studiích pozorován při indukci osteogenní diferenciaci (M. S. Kim et al. 2006; H. Kim, Kim, and Suh 2003; H. Kim et al. 2005; Nguyen et al. 2012) či redukci zánětu (Rubert et al. 2014; Webber et al. 2012). Postupné uvolňování DEX bylo v některých studiích i po dobu 1 měsíce (H. Kim, Kim, and Suh 2003; Webber et al. 2012) či 3 měsíců (H. Kim et al. 2005).



Uvolňování DEX bylo pozorováno u různých systémů. Vytvořený nosič z PCL či jeho kombinací s jinou látkou podporoval v jiných studiích kontrolované uvolňování malých molekul jako DEX (M. S. Kim et al. 2006), či jiných léků (simvastatin) uchovávajících si svou aktivitu po uvolnění (Rubert et al. 2014). Kromě PCL se DEX kontrolovaně uvolňoval i u jiných polymerů (PLGA) (Hickey et al. 2002; Zolnik and Burgess 2008; H. Kim, Kim, and Suh 2003). DEX pelety obalené PVA uvolňovaly asi 1  $\mu\text{g/hod}$  *in vitro* a 1.5  $\mu\text{g/hr}$  *in vivo* a po implantaci do tkáně se uvolňovala koncentrace 2.5  $\pm$  1.2  $\mu\text{g/hr}$  po dobu 3 měsíců (HAINSWORTH et al. 1996).

U některých studií docházelo k velkému počátečnímu uvolnění DEX s následným postupným uvolňováním (Rubert et al. 2014; Hickey et al. 2002; Son et al. 2011). Např. u Podobně i PLGA mikrosféry s vloženým DEX vytvořeny technikou vodě-olejové emulze nejprve vykazovaly počáteční uvolnění DEX. Po modifikaci techniky se DEX uvolňoval po dobu 1 měsíce (Hickey et al. 2002). Koaxiální a emulzní nanovlákná by mohla představovat systém trvalejšího uvolňování, avšak i u koaxiálních nanovláken vytvořených elektrostatickým zvlákňováním (Rubert et al. 2014), došlo k velkému počátečnímu uvolnění DEX během prvních 0,5-3 hodin a následným postupným uvolňováním během 12 dní. Obecně je potřeba vytvářet a modulovat takové nosiče, aby k tomuto počátečnímu uvolnění příliš nedocházelo a látka se z nosiče uvolňovala postupně.

Poslední experimentální set testoval efekt různých koncentrací DEX a standardních koncentrací A2P a ITS-X enkapsulovaných do nanovláken (viz tab. č. 9). V tomto pokusu byly do vláken uzavřeny koncentrace DEX podobně jako v pokusu č. 4. Kontroly 6Kpl, 6Kb a skupina 6PLM byly stejné pro pokus č. 5 i 6. Výsledky korelovaly s výsledky z pokusu č. 4. Koncentrace DEX neměla signifikantní efekt na metabolickou aktivitu (graf č. 29) nebo proliferaci skupin (graf č. 30), mezi skupinami nebyly velké rozdíly. Pokus ukázal, že skupina 6PLM s dvojnásobnou koncentrací všech složek, než v diferenciálním médiu měla oproti jiným skupinám vhodnější profil exprese chondrogenních markerů chondrocytů kultivované na nosičích. Současně byly chondrocyty kultivované na této skupině metabolicky aktivní a proliferující.

#### Uplatnitelnost výsledků

Nanovláknenné nosiče z PCL jsou vhodné ke kultivaci a podporují rediferenciaci primárních chondrocytů, což bylo potvrzeno i v další studii (Garcia-Giralt et al. 2008a), v níž na PCL nosičích chondrocyty proliferovaly a exprimovaly geny pro chondrogenní markery (kolagen typu II, agrekan). Klasická cesta v tkáňovém inženýrství je založena na odebrání

chondrocytů pacientovi (ACI), které se dále kultivují *in vitro* a jsou vloženy zpět do místa defektu. Oproti této buněčné cestě existuje ještě „bezuněčná“ varianta, kdy nosič z biomateriálu v kombinaci s vhodnými chondrogenními molekulami pomáhá migraci MSC do místa defektu a jeho regeneraci. U tohoto přístupu odpadají rizika spojená s kultivací buněk *in vitro* (riziko kontaminace, dediferenciace buněk) a rovněž nutnost operačního zákroku při odběru biopsie pro izolaci buněk. To snižuje zdravotní zátěž na pacienta při léčbě a zlevňuje celý proces. Vzhledem k zvyšujícímu se počtu pacientů s muskulo-artikulární problémy ročně se jedná o novou terapeutickou metodu, která může napomoci rychlejší léčbě chrupavčitých defektů s méně riziky, než při ACI (kontaminace, záněty v místě odběru, limitace odběrového místa apod.).

Systém prezentovaný v této práci se snaží vytvořit nanovláknenný nosič s uvolňujícími se chondrogenními suplementy v koncentracích podporujících chondrogenní diferenciaci MSC a udržující chondrogenní fenotyp izolovaných primárních chondrocytů. Byly testovány různé koncentrace suplementů chondrogenního média A2P a DEX napomáhající chondrální diferenciaci a růstu.

Vhodným výběrem optimálních koncentrací suplementů chondrogenního diferenciačního média lze zvýšit proliferaci, metabolickou aktivitu chondrocytů a expresi genů pro chondrogenní markery. Výsledky testování ukazují, že skupina 5PLM umožňuje zlepšení uvedených parametrů pomocí speciálního nosiče, který díky uvolnění aktivních látek stimuluje chondrocyty k udržení chondrogenního fenotypu. Takový systém je uplatnitelný pro udržení chondrogenního fenotypu primárních chondrocytů a chondrogenní diferenciaci MSC *in vitro*. Připravený materiál má potenciál i jako náhrada chrupavky *in vivo*. Samotný nosič umožňuje implantaci do těla pacienta a působení uvolňujících se chondrogenních suplementů v místě poranění. Z ekonomického pohledu se jedná o nosič z komponent schválených pro užití v medicíně, což ulehčí potenciální přenos poznatků do praxe.

Limitací současné studie je zejména testování jen v podmínkách *in vitro*. Pokusy probíhaly na primárních buňkách prasečího původu a ukázaly potenciál nosiče 5PLM. Limitací systému je i to, že zatím nebyl testován pomocí MSC, aby se potvrdil jeho potenciál k jejich diferenciaci. V podmínkách *in vivo*, může docházet k jiné reakci a systém může reagovat jinak.

## 5. ZÁVĚR

Cílem práce bylo testování PCL nanovlákných nosičů s primárními prasečími chondrocyty a nalezení ideální koncentrace chondrogenních suplementů A2P a DEX přidávanými do kultivačního média, či uzavřenými přímo do nanovláken. Byl sledován vliv koncentrací těchto suplementů na metabolickou aktivitu, proliferaci a udržení chondrogenního fenotypu primárních chondrocytů. Pomocí RT-PCR metody byla sledována exprese genů pro chondrogenní markery kolagenu typu II a agrekanu, proteiny produkované chondrocyty tvořící chrupavčitou ECM. Spolu s nimi byla sledována i exprese genu pro kolagen typu I, který značí dediferenciaci chondrocytů. Jedním z cílů práce bylo nalezení vhodné koncentrace suplementů, které podněcují zvýšení metabolické aktivity, proliferaci a indukci exprese chondrogenních markerů. Tyto ideální koncentrace byly posléze vloženy přímo do nanovláken za tvorby funkcionalizovaného nosiče. Z něho by se měly látky postupně uvolňovat a podněcovat migraci buněk do místa defektu, jejich růst a diferenciaci pro regeneraci výsledné tkáně. Metabolická aktivita chondrocytů se zvyšovala spolu se vzrůstající koncentrací chondrogenního suplementu A2P, který se nacházel v kultivačním médiu samostatně v různých koncentracích, avšak mezi skupinami nebyly velké rozdíly v proliferaci, samotný A2P rovněž příliš neindukoval expresi genů pro chondrogenní markery. Po doplnění různých koncentrací A2P o neměnné koncentrace dalších suplementů DEX a ITS-X, ještě vzrostla metabolická aktivita a proliferace chondrocytů. Suplementy DEX a ITS-X působily synergicky s A2P. Exprese genů pro kolagen typu I a II byla zvýšena. Pokud se DEX nacházel v médiu samostatně v různých koncentracích, neindukoval zvýšení metabolické aktivity, ani proliferaci, působil inhibičně. Samotný DEX byl však schopen iniciovat expresi chondrogenních markerů kolagenu typu II a agrekanu. Při doplnění různých koncentrací DEX o neměnné koncentrace A2P a ITS-X došlo ke snížení inhibičního vlivu, zvyšovala se metabolická aktivita a proliferace. V první části experimentální práce tedy bylo potvrzeno, že A2P podporoval metabolickou aktivitu a proliferaci chondrocytů, na expresi chondrogenních markerů však neměl vliv. DEX naopak buněčný růst inhiboval, nicméně podporoval expresi genů pro kolagen typu II a agrekan. Pokud byly použity oba tyto suplementy v kombinaci s ITS-X, byl prokázán jejich synergický efekt.

Vybrané koncentrace byly vloženy do nanovláken a bylo sledováno jejich postupné uvolňování. Skupina PLM, obsahující chondrogenní suplementy vložené do PCL nanovláken (A2P - 100  $\mu\text{g/ml}$ , DEX - 200 nM, ITS-X - 2%) podporovala metabolickou aktivitu a proliferaci chondrocytů a měla v porovnání s ostatními skupinami zvýšený expresní profil

chondrogenního markeru kolagenu typu II. Tato skupina se jeví jako vhodná pro další testování PCL nosičů pro řízenou chondrogenní diferenciaci. Je potřeba provést další studie efektu těchto suplementů na chondrocyty v kombinaci s nanovláčnými nosiči pro tvorbu funkcionalizovaného nosiče s praktickým využitím v tkáňovém inženýrství. Kromě udržení chondrogenního fenotypu by měl být systém schopen i indukce chondrogenese. Dalším vhodným rozšířením je tedy testování nosiče pro MSC. Ty při použití bezbuněčných nosičů migrují z kostní krve do místa defektu, kde by se dále měly diferencovat do chondrocytů.

## 6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Adolphe, Monique, Sophie Thenet-Gauci, and Sylvie Demignot. 1997. "Chondrocyte Culture: A Target System to Evaluate: Pharmacotoxicological Effects of Drugs." *In Vitro Methods in Pharmaceutical Research*, January, 181–207. <https://doi.org/10.1016/B978-012163390-5.50009-0>.
- Agarwal, Seema, Joachim H. Wendorff, and Andreas Greiner. 2008. "Use of Electrospinning Technique for Biomedical Applications." *Polymer* 49 (26): 5603–21. <https://doi.org/10.1016/J.POLYMER.2008.09.014>.
- Agrogiannis, Georgios D, Stavros Sifakis, Efstratios S Patsouris, and Anastasia E Konstantinidou. 2014. "Insulin-like Growth Factors in Embryonic and Fetal Growth and Skeletal Development (Review)." *Molecular Medicine Reports* 10 (2): 579–84. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2258>.
- Akiyama, Haruhiko, Marie-Christine Chaboissier, James F Martin, Andreas Schedl, and Benoit de Crombrughe. 2002. "The Transcription Factor Sox9 Has Essential Roles in Successive Steps of the Chondrocyte Differentiation Pathway and Is Required for Expression of Sox5 and Sox6." *Genes & Development* 16 (21): 2813–28. <https://doi.org/10.1101/gad.1017802>.
- Ali, S. A. M., P. J. Doherty, and D. F. Williams. 1994. "The Mechanisms of Oxidative Degradation of Biomedical Polymers by Free Radicals." *Journal of Applied Polymer Science* 51 (8): 1389–98. <https://doi.org/10.1002/app.1994.070510805>.
- Awad, Hani A., M. Quinn Wickham, Holly A. Leddy, Jeffrey M. Gimble, and Farshid Guilak. 2004. "Chondrogenic Differentiation of Adipose-Derived Adult Stem Cells in Agarose, Alginate, and Gelatin Scaffolds." *Biomaterials* 25 (16): 3211–22. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.10.045>.
- Behrens, J. 2000. "Cross-Regulation of the Wnt Signalling Pathway: A Role of MAP Kinases." *Journal of Cell Science* 113 ( Pt 6) (March): 911–19.
- Berninger, Markus T, Gabriele Wexel, Ernst J Rummeny, Andreas B Imhoff, Martina Anton, Tobias D Henning, and Stephan Vogt. 2013. "Matrix-Assisted Autologous Chondrocyte Transplantation for Remodeling and Repair of Chondral Defects in a Rabbit Model." *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, no. 75 (May): e4422. <https://doi.org/10.3791/4422>.
- Bhanot, P, M Brink, C H Samos, J C Hsieh, Y Wang, J P Macke, D Andrew, J Nathans, and R Nusse. 1996. "A New Member of the Frizzled Family from Drosophila Functions as a Wingless Receptor." *Nature* 382 (6588): 225–30. <https://doi.org/10.1038/382225a0>.

- Bhardwaj, Nandana, and Subhas C. Kundu. 2010. "Electrospinning: A Fascinating Fiber Fabrication Technique." *Biotechnology Advances* 28 (3): 325–47. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.01.004>.
- Bi, W, W Huang, D J Whitworth, J M Deng, Z Zhang, R R Behringer, and B de Crombrughe. 2001. "Haploinsufficiency of Sox9 Results in Defective Cartilage Primordia and Premature Skeletal Mineralization." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (12): 6698–6703. <https://doi.org/10.1073/pnas.111092198>.
- Bi, Weimin, Jian Min Deng, Zhaoping Zhang, Richard R. Behringer, and Benoit de Crombrughe. 1999. "Sox9 Is Required for Cartilage Formation." *Nature Genetics* 22 (1): 85–89. <https://doi.org/10.1038/8792>.
- Bonaventure, J, N Kadhom, L Cohen-Solal, K H Ng, J Bourguignon, C Lasselin, and P Freisinger. 1994. "Reexpression of Cartilage-Specific Genes by Dedifferentiated Human Articular Chondrocytes Cultures in Alginate Beads." *Exp. Cell Res.* <https://doi.org/10.1006/excr.1994.1123>.
- Brittberg, Mats, Anders Lindahl, Anders Nilsson, Claes Ohlsson, Olle Isaksson, and Lars Peterson. 1994. "Treatment of Deep Cartilage Defects in the Knee with Autologous Chondrocyte Transplantation." *New England Journal of Medicine* 331 (14): 889–95. <https://doi.org/10.1056/NEJM199410063311401>.
- Buckwalter, J A, and H J Mankin. 1998a. "Articular Cartilage: Degeneration and Osteoarthritis, Repair, Regeneration, and Transplantation." *Instructional Course Lectures* 47: 487–504.
- . 1998b. "Articular Cartilage: Tissue Design and Chondrocyte-Matrix Interactions." *Instructional Course Lectures* 47: 477–86.
- Buzgo, Matej, Jarmila Greplová, Miroslav Soral, Dagmar Bezděková, Andrea Míčková, Olga Kofroňová, Oldřich Benada, Jan Hlaváč, and Evžen Amler. 2015. "PVA Immunonanofibers with Controlled Decay." *Polymer* 77 (October): 387–98. <https://doi.org/10.1016/J.POLYMER.2015.09.018>.
- Buzgo, Matej, Radka Jakubova, Andrea Mickova, Michala Rampichova, Eva Prosecka, Petra Kochova, David Lukas, and Evžen Amler. 2013. "Time-Regulated Drug Delivery System Based on Coaxially Incorporated Platelet  $\alpha$ -Granules for Biomedical Use." *Nanomedicine* 8 (7): 1137–54. <https://doi.org/10.2217/nnm.12.140>.
- Buzgo, Matej, Michala Rampichova, Karolina Vocetkova, Vera Sovkova, Vera Lukasova, Miroslav Doupnik, Andrea Mickova, Franco Rustichelli, and Evzen Amler. 2017. "Emulsion Centrifugal Spinning for Production of 3D Drug Releasing Nanofibres with Core/Shell Structure." *RSC Advances* 7 (3): 1215–28. <https://doi.org/10.1039/C6RA26606A>.
- Caron, M.M.J., P.J. Emans, M.M.E. Coolen, L. Voss, D.A.M. Surtel, A. Cremers, L.W. van Rhijn, and T.J.M. Welting. 2012. "Redifferentiation of Dedifferentiated Human Articular Chondrocytes: Comparison of 2D and 3D Cultures." *Osteoarthritis and Cartilage* 20 (10): 1170–78. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2012.06.016>.
- Carr, Andrew J, Otto Robertsson, Stephen Graves, Andrew J Price, Nigel K Arden, Andrew Judge, and David J Beard. 2012. "Knee Replacement." *Lancet (London, England)* 379 (9823): 1331–40. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60752-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60752-6).
- Carreira, A.C., F.H. Lojudice, E. Halcsik, R.D. Navarro, M.C. Sogayar, and J.M. Granjeiro. 2014. "Bone Morphogenetic Proteins." *Journal of Dental Research* 93 (4): 335–45.

<https://doi.org/10.1177/0022034513518561>.

- Carrington, J L, P Chen, M Yanagishita, and A H Reddi. 1991. "Osteogenin (Bone Morphogenetic Protein-3) Stimulates Cartilage Formation by Chick Limb Bud Cells in Vitro." *Developmental Biology* 146 (2): 406–15.
- Chen, C.W., Y.H. Tsai, W.P. Deng, S.N. Shih, C.L. Fang, J.G. Burch, W.H. Chen, and W.F. Lai. 2005. "Type I and II Collagen Regulation of Chondrogenic Differentiation by Mesenchymal Progenitor Cells." *Journal of Orthopaedic Research* 23 (2): 446–53. <https://doi.org/10.1016/J.ORTHRES.2004.09.002>.
- Chen, D.R, J.Z Bei, and S.G Wang. 2000. "Polycaprolactone Microparticles and Their Biodegradation." *Polymer Degradation and Stability* 67 (3): 455–59. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(99\)00145-7](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(99)00145-7).
- Chen, Guiqian, Chuxia Deng, and Yi-Ping Li. 2012. "TGF- $\beta$  and BMP Signaling in Osteoblast Differentiation and Bone Formation." *International Journal of Biological Sciences* 8 (2): 272–88. <https://doi.org/10.7150/ijbs.2929>.
- Chen, Guoping, Takashi Sato, Takashi Ushida, Rei Hirochika, and Tetsuya Tateishi. 2003. "Redifferentiation of Dedifferentiated Bovine Chondrocytes When Cultured in Vitro in a PLGA-Collagen Hybrid Mesh." *FEBS Letters* 542 (1–3): 95–99.
- Chen, Jie-Lin, Li Duan, Weimin Zhu, Jianyi Xiong, and Daping Wang. 2014. "Extracellular Matrix Production in Vitro in Cartilage Tissue Engineering." *Journal of Translational Medicine* 12 (April): 88. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-88>.
- Chen, Jinwu, Changyong Wang, Shuanghong Lü, Junzheng Wu, Ximin Guo, Cuimi Duan, Lingzhi Dong, et al. 2005. "In Vivo Chondrogenesis of Adult Bone-Marrow-Derived Autologous Mesenchymal Stem Cells." *Cell and Tissue Research* 319 (3): 429–38. <https://doi.org/10.1007/s00441-004-1025-0>.
- Cherubino, P, F A Grassi, P Bulgheroni, and M Ronga. 2003. "Autologous Chondrocyte Implantation Using a Bilayer Collagen Membrane: A Preliminary Report." *J Orthop Surg (Hong Kong)* 11 (1): 10–15. <https://doi.org/10.1177/230949900301100104>.
- Chimal-Monroy, J, and L Díaz de León. 1997. "Differential Effects of Transforming Growth Factors Beta 1, Beta 2, Beta 3 and Beta 5 on Chondrogenesis in Mouse Limb Bud Mesenchymal Cells." *The International Journal of Developmental Biology* 41 (1): 91–102.
- Chrysis, D, E M Ritzen, and L Säwendahl. 2003. "Growth Retardation Induced by Dexamethasone Is Associated with Increased Apoptosis of the Growth Plate Chondrocytes." *The Journal of Endocrinology* 176 (3): 331–37.
- Chrysis, Dionisios, Farasat Zaman, Andrei S. Chagin, Masaharu Takigawa, and Lars Säwendahl. 2005. "Dexamethasone Induces Apoptosis in Proliferative Chondrocytes through Activation of Caspases and Suppression of the Akt-Phosphatidylinositol 3'-Kinase Signaling Pathway." *Endocrinology* 146 (3): 1391–97. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1152>.
- Chua, K. H., B. S. Aminuddin, N. H. Fuzina, and B. H.I. Ruszymah. 2005. "Insulin-Transferrin-Selenium Prevent Human Chondrocyte Dedifferentiation and Promote the Formation of High Quality Tissue Engineered Human Hyaline Cartilage." *European Cells and Materials* 9: 58–67. <https://doi.org/10.22203/eCM.v009a08>.
- Chun, Jang-Soo, Hwanhee Oh, Siyoung Yang, and Meeyoung Park. 2008. "Wnt Signaling in Cartilage Development and Degeneration." *BMB Reports* 41 (7): 485–94.

- Cigan, Alexander D., Robert J. Nims, Michael B. Albro, John D. Esau, Marissa P. Dreyer, Gordana Vunjak-Novakovic, Clark T. Hung, and Gerard A. Ateshian. 2013. "Insulin, Ascorbate, and Glucose Have a Much Greater Influence Than Transferrin and Selenous Acid on the *In Vitro* Growth of Engineered Cartilage in Chondrogenic Media." *Tissue Engineering Part A* 19 (17–18): 1941–48. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2012.0596>.
- Clark, Amy G, Amy L Rohrbaugh, Ivan Otterness, and Virginia B Kraus. 2002. "The Effects of Ascorbic Acid on Cartilage Metabolism in Guinea Pig Articular Cartilage Explants." *Matrix Biology : Journal of the International Society for Matrix Biology* 21 (2): 175–84. [https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(01\)00193-7](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(01)00193-7).
- Cross, Marita, Emma Smith, Damian Hoy, Sandra Nolte, Ilana Ackerman, Marlene Fransen, Lisa Bridgett, et al. 2014. "The Global Burden of Hip and Knee Osteoarthritis: Estimates from the Global Burden of Disease 2010 Study." *Annals of the Rheumatic Diseases* 73 (7): 1323–30. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204763>.
- Curl, W W, J Krome, E S Gordon, J Rushing, B P Smith, and G G Poehling. 1997. "Cartilage Injuries: A Review of 31,516 Knee Arthroscopies." *Arthroscopy : The Journal of Arthroscopic & Related Surgery : Official Publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association* 13 (4): 456–60.
- Dabirian, F, S A Hosseini Ravandi, A R Pishevar, and R A Abuzade. 2011. "A Comparative Study of Jet Formation and Nanofiber Alignment in Electrospinning and Electrocentrifugal Spinning Systems." *Journal of Electrostatics* 69: 540–46. <https://doi.org/10.1016/j.elstat.2011.07.006>.
- Darling, Eric M., and Kyriacos A. Athanasiou. 2005a. "Rapid Phenotypic Changes in Passaged Articular Chondrocyte Subpopulations." *Journal of Orthopaedic Research* 23 (2): 425–32. <https://doi.org/10.1016/j.orthres.2004.08.008>.
- . 2005b. "Rapid Phenotypic Changes in Passaged Articular Chondrocyte Subpopulations." *Journal of Orthopaedic Research* 23 (2): 425–32. <https://doi.org/10.1016/j.orthres.2004.08.008>.
- Day, Timothy F, Xizhi Guo, Lisa Garrett-Beal, and Yingzi Yang. 2005. "Wnt/Beta-Catenin Signaling in Mesenchymal Progenitors Controls Osteoblast and Chondrocyte Differentiation during Vertebrate Skeletogenesis." *Developmental Cell* 8 (5): 739–50. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.03.016>.
- De, Antara. 2011. "Wnt/Ca<sup>2+</sup> Signaling Pathway: A Brief Overview." *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 43 (10): 745–56. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmr079>.
- Derfoul, Assia, Geraldine L. Perkins, David J. Hall, and Rocky S. Tuan. 2006. "Glucocorticoids Promote Chondrogenic Differentiation of Adult Human Mesenchymal Stem Cells by Enhancing Expression of Cartilage Extracellular Matrix Genes." *STEM CELLS* 24 (6): 1487–95. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0415>.
- Diekman, Brian O., Christopher R. Rowland, Donald P. Lennon, Arnold I. Caplan, and Farshid Guilak. 2010. "Chondrogenesis of Adult Stem Cells from Adipose Tissue and Bone Marrow: Induction by Growth Factors and Cartilage-Derived Matrix." *Tissue Engineering Part A* 16 (2): 523–33. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2009.0398>.
- Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F.C Marini, D.S. Krause, R.J. Deans, A. Keating, D.J. Prockop, and E.M. Horwitz. 2006. "Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement." *Cytotherapy* 8 (4): 315–17.
- Dragoo, Jason L., Grace Carlson, Frank McCormick, Haumith Khan-Farooqi, Min Zhu,

- Patricia A. Zuk, and Prosper Benhaim. 2007. "Healing Full-Thickness Cartilage Defects Using Adipose-Derived Stem Cells." *Tissue Engineering* 13 (7): 1615–21. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.0249>.
- East, Barbora, Martin Plencner, Martin Kralovic, Michala Rampichova, Věra Sovkova, Karolína Vocetkova, Martin Otahal, et al. 2018. "A Polypropylene Mesh Modified with Poly-ε-Caprolactone Nanofibers in Hernia Repair: Large Animal Experiment." *International Journal of Nanomedicine* Volume 13 (May): 3129–43. <https://doi.org/10.2147/IJN.S159480>.
- Eyrich, Daniela, Hinrich Wiese, Gerhard Maier, Daniel Skodacek, Bernhard Appel, Hatem Sarhan, Joerg Tessmar, et al. 2007. "In Vitro and In Vivo Cartilage Engineering Using a Combination of Chondrocyte-Seeded Long-Term Stable Fibrin Gels and Polycaprolactone-Based Polyurethane Scaffolds." *Tissue Engineering* 13 (9): 2207–18. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.0358>.
- Fernandes, Hugo, D Ph, Anouk Mentink, B Sc, Ruud Bank, and Reinout Stoop. 2010. "Endogenous Collagen Influences Differentiation." *Tissue Engineering Part A* 16 (5): 1693–1702.
- Florine, Emily M., Rachel E. Miller, Ryan M. Porter, Christopher H. Evans, Bodo Kurz, and Alan J. Grodzinsky. 2013. "Effects of Dexamethasone on Mesenchymal Stromal Cell Chondrogenesis and Aggrecanase Activity." *CARTILAGE* 4 (1): 63–74. <https://doi.org/10.1177/1947603512455196>.
- Formica, Florian A, Ece Öztürk, Samuel C Hess, Wendelin J Stark, Katharina Maniura-Weber, Markus Rottmar, and Marcy Zenobi-Wong. 2016. "A Bioinspired Ultraporous Nanofiber-Hydrogel Mimic of the Cartilage Extracellular Matrix." *Advanced Healthcare Materials* 5 (24): 3129–38. <https://doi.org/10.1002/adhm.201600867>.
- Franceschi, Renny T., and Bhanumathi S. Iyer. 2009. "Relationship between Collagen Synthesis and Expression of the Osteoblast Phenotype in MC3T3-E1 Cells." *Journal of Bone and Mineral Research* 7 (2): 235–46. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650070216>.
- Freed, L E, G Vunjak-Novakovic, R J Biron, D B Eagles, D C Lesnoy, S K Barlow, and R Langer. 1994. "Biodegradable Polymer Scaffolds for Tissue Engineering." *Bio/Technology (Nature Publishing Company)* 12 (7): 689–93.
- Friedenstein, A J, I I Piatetzky-Shapiro, and K V Petrakova. 1966. "Osteogenesis in Transplants of Bone Marrow Cells." *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 16 (3): 381–90.
- Friedman, Michael S., Michael W. Long, and Kurt D. Hankenson. 2006. "Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells Is Regulated by Bone Morphogenetic Protein-6." *Journal of Cellular Biochemistry* 98 (3): 538–54. <https://doi.org/10.1002/jcb.20719>.
- G., Schulze-Tanzil, P. de Souza, H. Villegas Castrejon, John T., Merker H.-J., Scheid A., and Shakibaei M. 2002. "Redifferentiation of Dedifferentiated Human Chondrocytes in High-Density Cultures." *Cell and Tissue Research* 308 (3): 371–79. <https://doi.org/10.1007/s00441-002-0562-7>.
- Gan, Lu, and Rita A. Kandel. 2007. "In Vitro Cartilage Tissue Formation by Co-Culture of Primary and Passaged Chondrocytes." *Tissue Engineering* 13 (4): 831–42. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.0231>.
- Garcia-Giralt, N., R. Izquierdo, X. Nogués, M. Perez-Olmedilla, P. Benito, J. L. Gómez-Ribelles, M. A. Checa, J. Suay, E. Caceres, and J. C. Monllau. 2008a. "A Porous PCL



- Scaffold Promotes the Human Chondrocytes Redifferentiation and Hyaline-Specific Extracellular Matrix Protein Synthesis.” *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 85 (4): 1082–89. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31670>.
- . 2008b. “A Porous PCL Scaffold Promotes the Human Chondrocytes Redifferentiation and Hyaline-Specific Extracellular Matrix Protein Synthesis.” *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 85A (4): 1082–89. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31670>.
- Gattazzo, Francesca, Anna Urciuolo, and Paolo Bonaldo. 2014. “Extracellular Matrix: A Dynamic Microenvironment for Stem Cell Niche.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1840 (8): 2506–19. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.01.010>.
- Gelse, K., A. B. Ekici, F. Cipa, B. Swoboda, H. D. Carl, A. Olk, F. F. Hennig, and P. Klinger. 2012. “Molecular Differentiation between Osteophytic and Articular Cartilage - Clues for a Transient and Permanent Chondrocyte Phenotype.” *Osteoarthritis and Cartilage* 20 (2): 162–71. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2011.12.004>.
- Gholamrezanezhad, Ali. 2011. *Stem Cells in Clinic and Research*. Edited by Ali Gholamrezanezhad. InTech. <https://doi.org/10.5772/740>.
- Griffith, L. G., and Gail Naughton. 2002. “Tissue Engineering--Current Challenges and Expanding Opportunities.” *Science* 295 (5557): 1009–14. <https://doi.org/10.1126/science.1069210>.
- HAINSWORTH, DEAN P., P. ANDREW PEARSON, JOHN D. CONKLIN, and PAUL ASHTON. 1996. “Sustained Release Intravitreal Dexamethasone.” *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* 12 (1): 57–63. <https://doi.org/10.1089/jop.1996.12.57>.
- Hangody, László, Gábor Vászárhelyi, László Rudolf Hangody, Zita Sükösd, György Tibay, Lajos Bartha, and Gábor Bodó. 2008. “Autologous Osteochondral Grafting—Technique and Long-Term Results.” *Injury* 39 (1): 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2008.01.041>.
- Hardin, John A., Neil Cobelli, and Laura Santambrogio. 2015. “Consequences of Metabolic and Oxidative Modifications of Cartilage Tissue.” *Nature Reviews Rheumatology* 11 (9): 521–29. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.70>.
- Hendrickson, Dean A., Alan J. Nixon, Daniel A. Grande, Rory J. Todhunter, Ronald M. Minor, Hollis Erb, and George Lust. 1994. “Chondrocyte-fibrin Matrix Transplants for Resurfacing Extensive Articular Cartilage Defects.” *Journal of Orthopaedic Research* 12 (4): 485–97. <https://doi.org/10.1002/jor.1100120405>.
- Hickey, T, D Kreutzer, D.J Burgess, and F Moussy. 2002. “Dexamethasone/PLGA Microspheres for Continuous Delivery of an Anti-Inflammatory Drug for Implantable Medical Devices.” *Biomaterials* 23 (7): 1649–56. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00291-5](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00291-5).
- Hildebrandt, Cornelia, Heiko Büth, and Hagen Thielecke. 2009. “Influence of Cell Culture Media Conditions on the Osteogenic Differentiation of Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells.” *Annals of Anatomy* 191 (1): 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2008.09.009>.
- Hill, Theo P, Daniela Später, Makoto M Taketo, Walter Birchmeier, and Christine Hartmann. 2005. “Canonical Wnt/Beta-Catenin Signaling Prevents Osteoblasts from Differentiating into Chondrocytes.” *Developmental Cell* 8 (5): 727–38. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.02.013>.
- Hirsch, Michelle S., Leif E. Lunsford, Vickery Trinkaus-Randall, and Kathy K.H. Svoboda.

1997. "Chondrocyte Survival and Differentiation in Situ Are Integrin Mediated." *Developmental Dynamics* 210 (3): 249–63. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(199711\)210:3<249::AID-AJA6>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(199711)210:3<249::AID-AJA6>3.0.CO;2-G).
- Hjelle, Karin, Eirik Solheim, Torbjørn Strand, Rune Muri, and Mats Brittberg. 2002. "Articular Cartilage Defects in 1,000 Knee Arthroscopies." *Arthroscopy : The Journal of Arthroscopic & Related Surgery : Official Publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association* 18 (7): 730–34.
- Hoemann, C. D., J. Sun, M. D. McKee, A. Chevrier, E. Rossomacha, G. E. Rivard, M. Hurtig, and M. D. Buschmann. 2007. "Chitosan-Glycerol Phosphate/Blood Implants Elicit Hyaline Cartilage Repair Integrated with Porous Subchondral Bone in Microdrilled Rabbit Defects." *Osteoarthritis and Cartilage* 15 (1): 78–89. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2006.06.015>.
- Holtzer, H, J Abbott, J Lash, and S Holtzer. 1960. "THE LOSS OF PHENOTYPIC TRAITS BY DIFFERENTIATED CELLS IN VITRO, I. DEDIFFERENTIATION OF CARTILAGE CELLS." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 46 (12): 1533–42.
- Hooper, J E. 1994. "Distinct Pathways for Autocrine and Paracrine Wingless Signalling in Drosophila Embryos." *Nature* 372 (6505): 461–64. <https://doi.org/10.1038/372461a0>.
- Horbelt, Daniel, Agnieszka Denkis, and Petra Knaus. 2012. "A Portrait of Transforming Growth Factor  $\beta$  Superfamily Signalling: Background Matters." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44 (3): 469–74. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2011.12.013>.
- Hossain, M. A., J. Park, S. H. Choi, and G. Kim. 2008. "Dexamethasone Induces Apoptosis in Proliferative Canine Tendon Cells and Chondrocytes." *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology* 21 (04): 337–42. <https://doi.org/10.3415/VCOT-07-06-0060>.
- Huang, Chao, Jingxing Dai, and Xin A. Zhang. 2015. "Environmental Physical Cues Determine the Lineage Specification of Mesenchymal Stem Cells." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1850 (6): 1261–66. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.02.011>.
- Huang, W, U I Chung, H M Kronenberg, and B de Crombrughe. 2001. "The Chondrogenic Transcription Factor Sox9 Is a Target of Signaling by the Parathyroid Hormone-Related Peptide in the Growth Plate of Endochondral Bones." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (1): 160–65. <https://doi.org/10.1073/pnas.011393998>.
- Huang, Zheng-Ming, Y.-Z. Zhang, M. Kotaki, and S. Ramakrishna. 2003. "A Review on Polymer Nanofibers by Electrospinning and Their Applications in Nanocomposites." *Composites Science and Technology* 63 (15): 2223–53. [https://doi.org/10.1016/S0266-3538\(03\)00178-7](https://doi.org/10.1016/S0266-3538(03)00178-7).
- Hung, Irene H, Kai Yu, Kory J Lavine, and David M Ornitz. 2007. "FGF9 Regulates Early Hypertrophic Chondrocyte Differentiation and Skeletal Vascularization in the Developing Stylopod." *Developmental Biology* 307 (2): 300–313. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.04.048>.
- Hutmacher, D W. 2000. "Scaffolds in Tissue Engineering Bone and Cartilage." *Biomaterials* 21 (24): 2529–43.
- Hutmacher, Dietmar Werner, Jan Thorsten Schantz, Christopher Xu Fu Lam, Kim Cheng Tan,

- and Thiam Chye Lim. 2007. "State of the Art and Future Directions of Scaffold-Based Bone Engineering from a Biomaterials Perspective." *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 1 (4): 245–60. <https://doi.org/10.1002/term.24>.
- Ibold, Y., C. Lübke, S. Pelz, H. Augst, C. Kaps, J. Ringe, and M. Sittinger. 2009. "Effect of Different Ascorbate Supplementations on in Vitro Cartilage Formation in Porcine High-Density Pellet Cultures." *Tissue and Cell* 41 (4): 249–56. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2008.12.001>.
- Imabayashi, Hideaki, Taisuke Mori, Satoshi Gojo, Tohru Kiyono, Tomoyasu Sugiyama, Ryotaro Irie, Takao Isogai, Jun-Ichi Hata, Yoshiaki Toyama, and Akihiro Umezawa. 2003. "Redifferentiation of Dedifferentiated Chondrocytes and Chondrogenesis of Human Bone Marrow Stromal Cells via Chondrosphere Formation with Expression Profiling by Large-Scale CDNA Analysis." [https://doi.org/10.1016/S0014-4827\(03\)00130-7](https://doi.org/10.1016/S0014-4827(03)00130-7).
- Jacob, Anne L, Craig Smith, Juha Partanen, and David M Ornitz. 2006. "Fibroblast Growth Factor Receptor 1 Signaling in the Osteo-Chondrogenic Cell Lineage Regulates Sequential Steps of Osteoblast Maturation." *Developmental Biology* 296 (2): 315–28. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.05.031>.
- James, Aaron W. 2013. "Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation." *Scientifica* 2013: 1–17. <https://doi.org/10.1155/2013/684736>.
- Javed, Amjad, Jong-Sup Bae, Faiza Afzal, Soraya Gutierrez, Jitesh Pratap, Sayyed K. Zaidi, Yang Lou, et al. 2008. "Structural Coupling of Smad and Runx2 for Execution of the BMP2 Osteogenic Signal." *Journal of Biological Chemistry* 283 (13): 8412–22. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705578200>.
- Jeong, Claire G., and Scott J. Hollister. 2010. "A Comparison of the Influence of Material on in Vitro Cartilage Tissue Engineering with PCL, PGS, and POC 3D Scaffold Architecture Seeded with Chondrocytes." *Biomaterials* 31 (15): 4304–12. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.145>.
- Jonason, J.H., G. Xiao, M. Zhang, L. Xing, and D. Chen. 2009. "Post-Translational Regulation of Runx2 in Bone and Cartilage." *Journal of Dental Research* 88 (8): 693–703. <https://doi.org/10.1177/0022034509341629>.
- Jones, D Leanne, and Amy J Wagers. 2008. "No Place like Home: Anatomy and Function of the Stem Cell Niche." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9 (1): 11–21. <https://doi.org/10.1038/nrm2319>.
- Kang, Sun-Woong, Sung Pil Yoo, and Byung-Soo Kim. 2007. "Effect of Chondrocyte Passage Number on Histological Aspects of Tissue-Engineered Cartilage." *Bio-Medical Materials and Engineering* 17 (5): 269–76.
- Karamboulas, K., H. J. Dranse, and T. M. Underhill. 2010. "Regulation of BMP-Dependent Chondrogenesis in Early Limb Mesenchyme by TGF Signals." *Journal of Cell Science* 123 (12): 2068–76. <https://doi.org/10.1242/jcs.062901>.
- Karp, S J, E Schipani, B St-Jacques, J Hunzelman, H Kronenberg, and A P McMahon. 2000. "Indian Hedgehog Coordinates Endochondral Bone Growth and Morphogenesis via Parathyroid Hormone Related-Protein-Dependent and -Independent Pathways." *Development (Cambridge, England)* 127 (3): 543–48.
- Kayakabe, M., S. Tsutsumi, H. Watanabe, Y. Kato, and K. Takagishi. 2006. "Transplantation of Autologous Rabbit BM-Derived Mesenchymal Stromal Cells Embedded in

- Hyaluronic Acid Gel Sponge into Osteochondral Defects of the Knee.” *Cytotherapy* 8 (4): 343–53. <https://doi.org/10.1080/14653240600845070>.
- Kim, Hyongbum, Hyun Woo Kim, and Hwal Suh. 2003. “Sustained Release of Ascorbate-2-Phosphate and Dexamethasone from Porous PLGA Scaffolds for Bone Tissue Engineering Using Mesenchymal Stem Cells.” *Biomaterials* 24 (25): 4671–79. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00358-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00358-2).
- Kim, Hyongbum, Hwal Suh, Sangmee Ahn Jo, Hyun Woo Kim, Jung Min Lee, Eun Hae Kim, Yvonne Reinwald, Sang-Hyug Park, Byoung-Hyun Min, and Inho Jo. 2005. “In Vivo Bone Formation by Human Marrow Stromal Cells in Biodegradable Scaffolds That Release Dexamethasone and Ascorbate-2-Phosphate.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 332 (4): 1053–60. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2005.05.051>.
- Kim, M.S., Sun Kyung Kim, Soon Hee Kim, Hoon Hyun, Gilson Khang, and Hai Bang Lee. 2006. “In Vivo Osteogenic Differentiation of Rat Bone Marrow Stromal Cells in Thermosensitive MPEG–PCL Diblock Copolymer Gels.” *Tissue Engineering* 12 (10): 2863–73. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.2863>.
- Kisiday, J, M Jin, B Kurz, H Hung, C Semino, S Zhang, and A J Grodzinsky. 2002. “Self-Assembling Peptide Hydrogel Fosters Chondrocyte Extracellular Matrix Production and Cell Division: Implications for Cartilage Tissue Repair.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (15): 9996–10001. <https://doi.org/10.1073/pnas.1423099999>.
- Knudson, Cheryl B, and Warren Knudson. 2001. “Cartilage Proteoglycans.” *Seminars in Cell & Developmental Biology* 12 (2): 69–78. <https://doi.org/10.1006/SCDB.2000.0243>.
- Kolf, Catherine M, Elizabeth Cho, and Rocky S Tuan. 2007. “Mesenchymal Stromal Cells. Biology of Adult Mesenchymal Stem Cells: Regulation of Niche, Self-Renewal and Differentiation.” *Arthritis Research & Therapy* 9 (1): 204. <https://doi.org/10.1186/ar2116>.
- Komori, T, and T Kishimoto. 1998. “Cbfa1 in Bone Development.” *Current Opinion in Genetics & Development* 8 (4): 494–99.
- Komori, Toshihisa. 2002. “Runx2, A Multifunctional Transcription Factor in Skeletal Development.” *Journal of Cellular Biochemistry* 87 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1002/jcb.10276>.
- Kumar, S, K A Balczarek, and Z C Lai. 1996. “Evolution of the Hedgehog Gene Family.” *Genetics* 142 (3): 965–72.
- Kuroda, R., K. Ishida, T. Matsumoto, T. Akisue, H. Fujioka, K. Mizuno, H. Ohgushi, S. Wakitani, and M. Kurosaka. 2007. “Treatment of a Full-Thickness Articular Cartilage Defect in the Femoral Condyle of an Athlete with Autologous Bone-Marrow Stromal Cells.” *Osteoarthritis and Cartilage* 15 (2): 226–31. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2006.08.008>.
- Lam, Christopher X. F., Dietmar W. Hutmacher, Jan-Thorsten Schantz, Maria Ann Woodruff, and Swee Hin Teoh. 2009. “Evaluation of Polycaprolactone Scaffold Degradation for 6 Months in Vitro and in Vivo.” *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 90A (3): 906–19. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32052>.
- Lanske, B, A C Karaplis, K Lee, A Luz, A Vortkamp, A Pirro, M Karperien, et al. 1996. “PTH/PTHrP Receptor in Early Development and Indian Hedgehog-Regulated Bone Growth.” *Science (New York, N.Y.)* 273 (5275): 663–66.

- Layman, D L, L Sokoloff, and E J Miller. 1972. "Collagen Synthesis by Articular in Monolayer Culture." *Experimental Cell Research* 73 (1): 107–12.
- Lee, K S, H J Kim, Q L Li, X Z Chi, C Ueta, T Komori, J M Wozney, et al. 2000. "Runx2 Is a Common Target of Transforming Growth Factor Beta1 and Bone Morphogenetic Protein 2, and Cooperation between Runx2 and Smad5 Induces Osteoblast-Specific Gene Expression in the Pluripotent Mesenchymal Precursor Cell Line C2C12." *Molecular and Cellular Biology* 20 (23): 8783–92.
- Lefebvre, Véronique, and Mona Dvir-Ginzberg. 2017. "SOX9 and the Many Facets of Its Regulation in the Chondrocyte Lineage." *Connective Tissue Research* 58 (1): 2–14. <https://doi.org/10.1080/03008207.2016.1183667>.
- Legate, K. R., S. A. Wickstrom, and R. Fassler. 2009. "Genetic and Cell Biological Analysis of Integrin Outside-in Signaling." *Genes & Development* 23 (4): 397–418. <https://doi.org/10.1101/gad.1758709>.
- Lemare, Francois, Nathalie Steimberg, and Caroline L E Griel. 1998. "In Alginate Beads : Restoration of the Differentiated Phenotype and of the Metabolic Responses to Interleukin-1 B" 313 (October 1997): 303–13.
- Leonard, C M, H M Fuld, D A Frenz, S A Downie, J Massagué, and S A Newman. 1991. "Role of Transforming Growth Factor-Beta in Chondrogenic Pattern Formation in the Embryonic Limb: Stimulation of Mesenchymal Condensation and Fibronectin Gene Expression by Exogenous TGF-Beta and Evidence for Endogenous TGF-Beta-like Activity." *Developmental Biology* 145 (1): 99–109.
- Leung, Victor Y L, Bo Gao, Keith K H Leung, Ian G Melhado, Sarah L Wynn, Tiffany Y K Au, Nelson W F Dung, et al. 2011. "SOX9 Governs Differentiation Stage-Specific Gene Expression in Growth Plate Chondrocytes via Direct Concomitant Transactivation and Repression." Edited by Veronica van Heyningen. *PLoS Genetics* 7 (11): e1002356. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002356>.
- Li, D., and Y. Xia. 2004. "Electrospinning of Nanofibers: Reinventing the Wheel?" *Advanced Materials* 16 (14): 1151–70. <https://doi.org/10.1002/adma.200400719>.
- Lian, Jane B, Gary S Stein, Amjad Javed, Andre J van Wijnen, Janet L Stein, Martin Montecino, Mohammad Q Hassan, Tripti Gaur, Christopher J Lengner, and Daniel W Young. 2006. "Networks and Hubs for the Transcriptional Control of Osteoblastogenesis." *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* 7 (1–2): 1–16. <https://doi.org/10.1007/s11154-006-9001-5>.
- Liao, Jiehong. 2011. "Modulation of Chondrogenic and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells through Signals in the Extracellular Microenvironment."
- Lin, Zhen, Jonathan B. Fitzgerald, Jiake Xu, Craig Willers, David Wood, Alan J. Grodzinsky, and Ming H. Zheng. 2008. "Gene Expression Profiles of Human Chondrocytes during Passaged Monolayer Cultivation." *Journal of Orthopaedic Research* 26 (9): 1230–37. <https://doi.org/10.1002/jor.20523>.
- Liu, Chia-Feng, and Véronique Lefebvre. 2015. "The Transcription Factors SOX9 and SOX5/SOX6 Cooperate Genome-Wide through Super-Enhancers to Drive Chondrogenesis." *Nucleic Acids Research* 43 (17): 8183–8203. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv688>.
- Liu, Mei, Xin Zeng, Chao Ma, Huan Yi, Zeeshan Ali, Xianbo Mou, Song Li, Yan Deng, and Nongyue He. 2017. "Injectable Hydrogels for Cartilage and Bone Tissue Engineering." *Bone Research* 5 (May): 17014. <https://doi.org/10.1038/boneres.2017.14>.

- Liu, Xia, Jinchun Liu, Ning Kang, Li Yan, Qian Wang, Xin Fu, Yuanyuan Zhang, Ran Xiao, and Yilin Cao. 2014. "Role of Insulin-Transferrin-Selenium in Auricular Chondrocyte Proliferation and Engineered Cartilage Formation in Vitro." *International Journal of Molecular Sciences* 15 (1): 1525–37. <https://doi.org/10.3390/ijms15011525>.
- Lu, Yao. 2016. "Centrifugal Spinning and Its Energy Storage Applications,." May.
- Lukáš, D., A. Sarkar, L. Martinová, K. Vodsed'álková, D. Lubasová, J. Chaloupek, P. Pokorný, P. Mikeš, J. Chvojka, and M. Komárek. 2009. "Physical Principles of Electrospinning (Electrospinning as a Nano-Scale Technology of the Twenty-First Century)." *Textile Progress* 41 (2): 59–140. <https://doi.org/10.1080/00405160902904641>.
- Lukas, David, Arindam Sarkar, and Pavel Pokorny. 2008. "Self-Organization of Jets in Electrospinning from Free Liquid Surface: A Generalized Approach." *Journal of Applied Physics* 103 (8): 084309. <https://doi.org/10.1063/1.2907967>.
- Luo, C. J., E. Stride, and M. Edirisinghe. 2012. "Mapping the Influence of Solubility and Dielectric Constant on Electrospinning Polycaprolactone Solutions." *Macromolecules* 45 (11): 4669–80. <https://doi.org/10.1021/ma300656u>.
- Mandl, Erik W, Simone W van der Veen, Jan a N Verhaar, and Gerjo J V M van Osch. 2002. "Serum-Free Medium Supplemented with High-Concentration FGF2 for Cell Expansion Culture of Human Ear Chondrocytes Promotes Redifferentiation Capacity." *Tissue Engineering* 8 (4): 573–80. <https://doi.org/10.1089/107632702760240490>.
- Marcacci, Maurilio, Massimo Berruto, Domenico Brocchetta, Antonio Delcogliano, Diego Ghinelli, Alberto Gobbi, Elisaveta Kon, et al. 2005. "Articular Cartilage Engineering with Hyalograft C: 3-Year Clinical Results." *Clinical Orthopaedics and Related Research*, no. 435 (June): 96–105.
- Mardani, Mohmmad, Batool Hashemibeni, Malek Masoud Ansar, Sayeed Hamid Zarkesh Esfahani, Mohmmad Kazemi, Vahid Goharian, Nafiseh Esmaeili, and Ebrahim Esfandiary. 2013. "Comparison between Chondrogenic Markers of Differentiated Chondrocytes from Adipose Derived Stem Cells and Articular Chondrocytes in Vitro." *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 16 (6): 763–71.
- Marie, Pierre J. 2008. "Transcription Factors Controlling Osteoblastogenesis." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 473 (2): 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.02.030>.
- Matson, John B., Christina J. Newcomb, Ronit Bitton, and Samuel I. Stupp. 2012. "Nanostructure-Templated Control of Drug Release from Peptide Amphiphile Nanofiber Gels." *Soft Matter* 8 (13): 3586. <https://doi.org/10.1039/c2sm07420f>.
- Matsuda, Chikayoshi, Mutsumi Takagi, Takako Hattori, Shigeyuki Wakitani, and Toshiomi Yoshida. 2005. "Differentiation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells to Chondrocytes for Construction of Three-Dimensional Cartilage Tissue." *Cytotechnology* 47 (1–3): 11–17. <https://doi.org/10.1007/s10616-005-3751-x>.
- Mauck, R. L., X. Yuan, and Rocky S. Tuan. 2006. "Chondrogenic Differentiation and Functional Maturation of Bovine Mesenchymal Stem Cells in Long-Term Agarose Culture." *Osteoarthritis and Cartilage* 14 (2): 179–89. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2005.09.002>.
- Mehta, Manav, Katharina Schmidt-Bleek, Georg N. Duda, and David J. Mooney. 2012. "Biomaterial Delivery of Morphogens to Mimic the Natural Healing Cascade in Bone." *Advanced Drug Delivery Reviews* 64 (12): 1257–76. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.05.006>.

- Méndez-Ferrer, Simón, David T. Scadden, and Abel Sánchez-Aguilera. 2015. "Bone Marrow Stem Cells: Current and Emerging Concepts." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1335 (1): 32–44. <https://doi.org/10.1111/nyas.12641>.
- Merino, Ramón, Yolanda Gañan, Domingo Macías, Aris N. Economides, Kuber T. Sampath, and Juan M. Hurlé. 1998. "Morphogenesis of Digits in the Avian Limb Is Controlled by FGFs, TGF $\beta$ s, and Noggin through BMP Signaling." *Developmental Biology* 200 (1): 35–45. <https://doi.org/10.1006/DBIO.1998.8946>.
- Mickova, Andrea, Matej Buzgo, Oldrich Benada, Michala Rampichova, Zdenek Fisar, Eva Filova, Martina Tesarova, David Lukas, and Evzen Amler. 2012. "Core/Shell Nanofibers with Embedded Liposomes as a Drug Delivery System." *Biomacromolecules* 13 (4): 952–62. <https://doi.org/10.1021/bm2018118>.
- Miller, E J, and V J Matukas. 1969. "Chick Cartilage Collagen: A New Type of Alpha 1 Chain Not Present in Bone or Skin of the Species." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 64 (4): 1264–68. <https://doi.org/10.1073/pnas.64.4.1264>.
- Minas, T, and S Nehrer. 1997. "Current Concepts in the Treatment of Articular Cartilage Defects." *Orthopedics* 20 (6): 525–38.
- Minina, Eleonora, Conny Kreschel, Michael C Naski, David M Ornitz, and Andrea Vortkamp. 2002. "Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP Signaling Integrates Chondrocyte Proliferation and Hypertrophic Differentiation." *Developmental Cell* 3 (3): 439–49.
- Mithoefer, Kai, Timothy McAdams, Riley J Williams, Peter C Kreuz, and Bert R Mandelbaum. 2009. "Clinical Efficacy of the Microfracture Technique for Articular Cartilage Repair in the Knee: An Evidence-Based Systematic Analysis." *The American Journal of Sports Medicine* 37 (10): 2053–63. <https://doi.org/10.1177/0363546508328414>.
- Munirah, S, S H Kim, B Hi Ruszymah, and G Khang. 2008. "The Use of Fibrin and Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Hybrid Scaffold for Articular Cartilage Tissue Engineering: An in Vivo Analysis." *European Cells & Materials* 15 (February): 41–52.
- Murad, S, D Grove, K A Lindberg, G Reynolds, A Sivarajah, and S R Pinnell. 1981. "Regulation of Collagen Synthesis by Ascorbic Acid." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (5): 2879–82.
- Na, Kun, Ji Hyun Park, Sung Won Kim, Bo Kyung Sun, Dae Gyun Woo, Hyung-Min Chung, and Keun-Hong Park. 2006. "Delivery of Dexamethasone, Ascorbate, and Growth Factor (TGF  $\beta$ -3) in Thermo-Reversible Hydrogel Constructs Embedded with Rabbit Chondrocytes." *Biomaterials* 27 (35): 5951–57. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2006.08.012>.
- Naito, Masako, Akiko Ohashi, and Tomihisa Takahashi. 2015a. "Dexamethasone Inhibits Chondrocyte Differentiation by Suppression of Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in the Chondrogenic Cell Line ATDC5." *Histochemistry and Cell Biology* 144 (3): 261–72. <https://doi.org/10.1007/s00418-015-1334-2>.
- . 2015b. "Dexamethasone Inhibits Chondrocyte Differentiation by Suppression of Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in the Chondrogenic Cell Line ATDC5." *Histochemistry and Cell Biology* 144 (3): 261–72. <https://doi.org/10.1007/s00418-015-1334-2>.
- Nakashima, Kazuhisa, and Benoit de Crombrughe. 2003. "Transcriptional Mechanisms in Osteoblast Differentiation and Bone Formation." *Trends in Genetics* 19 (8): 458–66.

- [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(03\)00176-8](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(03)00176-8).
- Naski, M C, J S Colvin, J D Coffin, and D M Ornitz. 1998. "Repression of Hedgehog Signaling and BMP4 Expression in Growth Plate Cartilage by Fibroblast Growth Factor Receptor 3." *Development (Cambridge, England)* 125 (24): 4977–88.
- Nguyen, Luong T.H., Susan Liao, Casey K. Chan, and Seeram Ramakrishna. 2012. "Electrospun Poly(L-Lactic Acid) Nanofibres Loaded with Dexamethasone to Induce Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells." *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* ahead-of-print (ahead-of-print): 1–21. <https://doi.org/10.1163/092050611X597807>.
- Nicodemus, Garret D., Idalis Villanueva, and Stephanie J. Bryant. 2007. "Mechanical Stimulation of TMJ Condylar Chondrocytes Encapsulated in PEG Hydrogels." *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 83A (2): 323–31. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31251>.
- Nie, Hemin, Beng Wee Soh, Yin-Chih Fu, and Chi-Hwa Wang. 2008. "Three-Dimensional Fibrous PLGA/HAp Composite Scaffold for BMP-2 Delivery." *Biotechnology and Bioengineering* 99 (1): 223–34. <https://doi.org/10.1002/bit.21517>.
- Niehrs, Christof. 2012. "The Complex World of WNT Receptor Signalling." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 13 (12): 767–79. <https://doi.org/10.1038/nrm3470>.
- Ohba, Shinsuke, Xinjun He, Hironori Hojo, and Andrew P. McMahon. 2015. "Distinct Transcriptional Programs Underlie Sox9 Regulation of the Mammalian Chondrocyte." *Cell Reports* 12 (2): 229–43. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.06.013>.
- Ornitz, David M, and Pierre J Marie. 2002. "FGF Signaling Pathways in Endochondral and Intramembranous Bone Development and Human Genetic Disease." *Genes & Development* 16 (12): 1446–65. <https://doi.org/10.1101/gad.990702>.
- Osch, G J van, S W van der Veen, and H L Verwoerd-Verhoef. 2001. "In Vitro Redifferentiation of Culture-Expanded Rabbit and Human Auricular Chondrocytes for Cartilage Reconstruction." *Plastic and Reconstructive Surgery* 107 (2): 433–40.
- Padron, Simon, Arturo Fuentes, Dumitru Caruntu, and Karen Lozano. 2013. "Experimental Study of Nanofiber Production through Forcespinning." *Journal of Applied Physics* 113 (2): 024318. <https://doi.org/10.1063/1.4769886>.
- Pan, Yong, Chengbing Wang, and Baolin Wang. 2009. "Phosphorylation of Gli2 by Protein Kinase A Is Required for Gli2 Processing and Degradation and the Sonic Hedgehog-Regulated Mouse Development." *Developmental Biology* 326 (1): 177–89. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.11.009>.
- Patil, Siddhesh D., Fotios Papadimitrakopoulos, and Diane J. Burgess. 2007. "Concurrent Delivery of Dexamethasone and VEGF for Localized Inflammation Control and Angiogenesis." *Journal of Controlled Release* 117 (1): 68–79. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2006.10.013>.
- Peterkofsky, B. 1991a. "Ascorbate Requirement for Hydroxylation and Secretion of Procollagen: Relationship to Inhibition of Collagen Synthesis in Scurvy." *American Journal of Clinical Nutrition* 54 (6 SUPPL.). <https://doi.org/10.1093/ajcn/54.6.1135s>.
- Peterkofsky, B. 1991b. "Ascorbate Requirement for Hydroxylation and Secretion of Procollagen: Relationship to Inhibition of Collagen Synthesis in Scurvy." *The American Journal of Clinical Nutrition* 54 (6): 1135S–1140S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/54.6.1135s>.



- Pittenger, M F, A M Mackay, S C Beck, R K Jaiswal, R Douglas, J D Mosca, M A Moorman, D W Simonetti, S Craig, and D R Marshak. 1999. "Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells." *Science (New York, N.Y.)* 284 (5411): 143–47.
- Poole, C A. 1997. "Articular Cartilage Chondrons: Form, Function and Failure." *Journal of Anatomy* 191 ( Pt 1: 1–13. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.1997.19110001.x>.
- Prante, Christian, Karen Bieback, Carsten Funke, Sylvia Schön, Susanne Kern, Joachim Kuhn, Martin Gastens, Knut Kleesiek, and Christian Götting. 2006. "The Formation of Extracellular Matrix During Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Correlates with Increased Levels of Xylosyltransferase I." *Stem Cells* 24 (10): 2252–61. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0508>.
- Puetzer, Jennifer L., John N. Petitte, and Elizabeth G. Lobo. 2010. "Comparative Review of Growth Factors for Induction of Three-Dimensional *In Vitro* Chondrogenesis in Human Mesenchymal Stem Cells Isolated from Bone Marrow and Adipose Tissue." *Tissue Engineering Part B: Reviews* 16 (4): 435–44. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2009.0705>.
- Ramakrishna, Seeram, Kazutoshi Fujihara, Wee-Eong Teo, Teik-Cheng Lim, and Zuwei Ma. 2005. *An Introduction to Electrospinning and Nanofibers*. WORLD SCIENTIFIC. <https://doi.org/10.1142/5894>.
- Rampichová, Michala, Matej Buzgo, Jiří Chvojka, Eva Prosecká, Olga Kofroňová, and Evžen Amler. 2014. "Cell Penetration to Nanofibrous Scaffolds." *Cell Adhesion & Migration* 8 (1): 36–41. <https://doi.org/10.4161/cam.27477>.
- Rampichová, Michala, Matej Buzgo, Andrea Míčková, Karolína Vocetková, Věra Sovková, Věra Lukášová, Eva Filová, Franco Rustichelli, and Evžen Amler. 2017. "Platelet-Functionalized Three-Dimensional Poly-ε-Caprolactone Fibrous Scaffold Prepared Using Centrifugal Spinning for Delivery of Growth Factors." *International Journal of Nanomedicine* 12: 347–61. <https://doi.org/10.2147/IJN.S120206>.
- Recha-Sancho, Lourdes, Franklin Moutos, Jordi Abellà, Farshid Guilak, and Carlos Semino. 2016. "Dedifferentiated Human Articular Chondrocytes Redifferentiate to a Cartilage-Like Tissue Phenotype in a Poly(ε-Caprolactone)/Self-Assembling Peptide Composite Scaffold." *Materials* 9 (6): 472. <https://doi.org/10.3390/ma9060472>.
- Reinhold, Martina I, Ravi M Kapadia, Zhixiang Liao, and Michael C Naski. 2006. "The Wnt-Inducible Transcription Factor Twist1 Inhibits Chondrogenesis." *The Journal of Biological Chemistry* 281 (3): 1381–88. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504875200>.
- Renate Lüllmann-Rauch. 2012. *Histologie - Překlad 3. Vydání*. 3. Grada.
- Ricard-Blum, Sylvie. 2011. "The Collagen Family." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3 (1): 1–19. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978>.
- Ricci, Claudio, Luisa Trombi, Ilaria Soriga, Fabio Piredda, Mario Milazzo, Cesare Stefanini, Luca Bruschini, Giuseppe Perale, Gianni Pertici, and Serena Danti. 2016. "Investigating the Microenvironmental Effects of Scaffold Chemistry and Topology in Human Mesenchymal Stromal Cell/Polymeric Hollow Microfiber Constructs." *Biomedical Science and Engineering*, May. <https://doi.org/10.4081/bse.2016.10>.
- Ronzière, M C, E Perrier, F Mallein-Gerin, and Anne-Marie Freyria. 2010. "Chondrogenic Potential of Bone Marrow- and Adipose Tissue-Derived Adult Human Mesenchymal Stem Cells." *Bio-Medical Materials and Engineering* 20 (3): 145–58. <https://doi.org/10.3233/BME-2010-0626>.
- Rubert, Marina, Yan-Fang Li, Jeppe Dehli, Mehmet Berat Taskin, Flemming Besenbacher, and Menglin Chen. 2014. "Dexamethasone Encapsulated Coaxial Electrospun PCL/PEO

- Hollow Microfibers for Inflammation Regulation.” *RSC Adv.* 4 (93): 51537–43. <https://doi.org/10.1039/C4RA08358J>.
- Ryoo, Hyun-Mo, Mi-Hye Lee, and Youn-Jeong Kim. 2006. “Critical Molecular Switches Involved in BMP-2-Induced Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Cells.” *Gene* 366 (1): 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.10.011>.
- Sahoo, Sambit, Lay Teng Ang, James Cho-Hong Goh, and Siew-Lok Toh. 2009. “Growth Factor Delivery through Electrospun Nanofibers in Scaffolds for Tissue Engineering Applications.” *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 93 (4): n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32645>.
- Sapkota, Gopal, Claudio Alarcón, Francesca M Spagnoli, Ali H Brivanlou, and Joan Massagué. 2007. “Balancing BMP Signaling through Integrated Inputs into the Smad1 Linker.” *Molecular Cell* 25 (3): 441–54. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.01.006>.
- Sarkar, Kamal, Carlos Gomez, Steve Zambrano, Michael Ramirez, Eugenio de Hoyos, Horacio Vasquez, and Karen Lozano. 2010. “Electrospinning to Forcespinning™.” *Materials Today* 13 (11): 12–14. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(10\)70199-1](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(10)70199-1).
- Schmierer, Bernhard, and Caroline S. Hill. 2007. “TGFβ-SMAD Signal Transduction: Molecular Specificity and Functional Flexibility.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8 (12): 970–82. <https://doi.org/10.1038/nrm2297>.
- Schnabel, M., S. Marlovits, G. Eckhoff, I. Fichtel, L. Gotzen, V. Vécsei, and J. Schlegel. 2002. “Dedifferentiation-Associated Changes in Morphology and Gene Expression in Primary Human Articular Chondrocytes in Cell Culture.” *Osteoarthritis and Cartilage* 10 (1): 62–70. <https://doi.org/10.1053/joca.2001.0482>.
- Schofield, R. 1978. “The Relationship between the Spleen Colony-Forming Cell and the Haemopoietic Stem Cell.” *Blood Cells* 4 (1–2): 7–25.
- Schuh, Elena, Sandra Hofmann, Kathryn Stok, Holger Notbohm, Ralph Müller, and Nicole Rotter. 2012. “Chondrocyte Redifferentiation in 3D: The Effect of Adhesion Site Density and Substrate Elasticity.” *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 100A (1): 38–47. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.33226>.
- Schuurman, Wouter, Peter A Levett, Michiel W Pot, Paul René van Weeren, Wouter J A Dhert, Dietmar W Hutmacher, Ferry P W Melchels, Travis J Klein, and Jos Malda. 2013. “Gelatin-Methacrylamide Hydrogels as Potential Biomaterials for Fabrication of Tissue-Engineered Cartilage Constructs.” *Macromolecular Bioscience* 13 (5): 551–61. <https://doi.org/10.1002/mabi.201200471>.
- Sekiya, I, P Koopman, K Tsuji, S Mertin, V Harley, Y Yamada, K Shinomiya, A Nifuji, and M Noda. 2001. “Dexamethasone Enhances SOX9 Expression in Chondrocytes.” *The Journal of Endocrinology* 169 (3): 573–79.
- Selmi, T. A. S., P. Verdonk, P. Chambat, F. Dubrana, J.-F. Potel, L. Barnouin, and P. Neyret. 2008. “Autologous Chondrocyte Implantation in a Novel Alginate-Agarose Hydrogel: OUTCOME AT TWO YEARS.” *Journal of Bone and Joint Surgery - British Volume* 90-B (5): 597–604. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.90B5.20360>.
- Seo, Hwa-Seon, and Rosa Serra. 2007. “Deletion of Tgfb2 in Prx1-Cre Expressing Mesenchyme Results in Defects in Development of the Long Bones and Joints.” *Developmental Biology* 310 (2): 304–16. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.07.040>.
- Shen, Bojiang, Aiqun Wei, Shane Whittaker, Lisa A. Williams, Helen Tao, David D.F. Ma, and Ashish D. Diwan. 2010. “The Role of BMP-7 in Chondrogenic and Osteogenic Differentiation of Human Bone Marrow Multipotent Mesenchymal Stromal Cells in

- Vitro.” *Journal of Cellular Biochemistry* 109 (2): 406–16.  
<https://doi.org/10.1002/jcb.22412>.
- Shin, Hyunjun, Mi Nam Lee, Jin Seung Choung, Sanghee Kim, Byung Hyune Choi, Minsoo Noh, and Jennifer H. Shin. 2016. “Focal Adhesion Assembly Induces Phenotypic Changes and Dedifferentiation in Chondrocytes.” *Journal of Cellular Physiology* 231 (8): 1822–31. <https://doi.org/10.1002/jcp.25290>.
- Sill, Travis J., and Horst A. von Recum. 2008. “Electrospinning: Applications in Drug Delivery and Tissue Engineering.” *Biomaterials* 29 (13): 1989–2006.  
<https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2008.01.011>.
- Silva Meirelles, L. da, Pedro Cesar Chagastelles, and Nance Beyer Nardi. 2006. “Mesenchymal Stem Cells Reside in Virtually All Post-Natal Organs and Tissues.” *Journal of Cell Science* 119 (11): 2204–13. <https://doi.org/10.1242/jcs.02932>.
- Singh, Purva, and Jean E Schwarzbauer. 2012. “Fibronectin and Stem Cell Differentiation - Lessons from Chondrogenesis.” *Journal of Cell Science* 125 (Pt 16): 3703–12.  
<https://doi.org/10.1242/jcs.095786>.
- Smink, J J, J A Koedam, J G Koster, and S C van Buul-Offers. 2002. “Dexamethasone-Induced Growth Inhibition of Porcine Growth Plate Chondrocytes Is Accompanied by Changes in Levels of IGF Axis Components.” *The Journal of Endocrinology* 174 (2): 343–52.
- Son, Jun Sik, Mark Appleford, Joo L. Ong, Joseph C. Wenke, Jong Min Kim, Seok Hwa Choi, and Daniel S. Oh. 2011. “Porous Hydroxyapatite Scaffold with Three-Dimensional Localized Drug Delivery System Using Biodegradable Microspheres.” *Journal of Controlled Release* 153 (2): 133–40. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2011.03.010>.
- Spagnoli, Anna, Lynda O’Rear, Ronald L. Chandler, Froilan Granero-Molto, Douglas P. Mortlock, Agnieszka E. Gorska, Jared A. Weis, et al. 2007. “TGF- $\beta$  Signaling Is Essential for Joint Morphogenesis.” *The Journal of Cell Biology* 177 (6): 1105–17.  
<https://doi.org/10.1083/jcb.200611031>.
- St-Jacques, B, M Hammerschmidt, and A P McMahon. 1999. “Indian Hedgehog Signaling Regulates Proliferation and Differentiation of Chondrocytes and Is Essential for Bone Formation.” *Genes & Development* 13 (16): 2072–86.
- Steadman, J Richard, William G Rodkey, and Karen K Briggs. 2002. “Microfracture to Treat Full-Thickness Chondral Defects: Surgical Technique, Rehabilitation, and Outcomes.” *The Journal of Knee Surgery* 15 (3): 170–76.
- Stenhamre, H., U. Nannmark, A. Lindahl, P. Gatenholm, and M. Brittberg. 2011. “Influence of Pore Size on the Redifferentiation Potential of Human Articular Chondrocytes in Poly(Urethane Urea) Scaffolds.” *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 5 (7): 578–88. <https://doi.org/10.1002/term.350>.
- Stenhamre, Hanna, Anna Thorvaldsson, Lars Enochson, Pernilla Walkenström, Anders Lindahl, Mats Brittberg, and Paul Gatenholm. 2013. “Nanosized Fibers’ Effect on Adult Human Articular Chondrocytes Behavior.” *Materials Science and Engineering C* 33 (3): 1539–45. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.12.059>.
- Stockdale, F.E., J. Abbott, S. Holtzer, and H. Holtzer. 1963. “The Loss of Phenotypic Traits by Differentiated Cells: II. Behavior of Chondrocytes and Their Progeny in Vitro.” *Developmental Biology* 7 (January): 293–302. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(63\)90125-8](https://doi.org/10.1016/0012-1606(63)90125-8).
- Stros, M, D Launholt, and K D Grasser. 2007. “The HMG-Box: A Versatile Protein Domain

- Occurring in a Wide Variety of DNA-Binding Proteins.” *Cellular and Molecular Life Sciences* : CMLS 64 (19–20): 2590–2606. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7162-3>.
- Sun, Hongfan, Lin Mei, Cunxian Song, Xiumin Cui, and Pengyan Wang. 2006. “The in Vivo Degradation, Absorption and Excretion of PCL-Based Implant.” *Biomaterials* 27 (9): 1735–40. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2005.09.019>.
- Szöke, Krisztina, Jana Daňková, Matej Buzgo, Evžen Amler, Jan E. Brinchmann, and Esben Østrup. 2017. “The Effect of Medium Composition on Deposition of Collagen Type 1 and Expression of Osteogenic Genes in Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Adipose Tissue and Bone Marrow.” *Process Biochemistry* 59: 321–28. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.10.011>.
- Takeda, S, J P Bonnamy, M J Owen, P Ducy, and G Karsenty. 2001. “Continuous Expression of Cbfa1 in Nonhypertrophic Chondrocytes Uncovers Its Ability to Induce Hypertrophic Chondrocyte Differentiation and Partially Rescues Cbfa1-Deficient Mice.” *Genes & Development* 15 (4): 467–81. <https://doi.org/10.1101/gad.845101>.
- Tay, Franklin R, David H Pashley, M Chad Williams, Rakesh Raina, Robert J Loushine, R Norman Weller, W Frank Kimbrough, and Nigel M King. 2005. “Susceptibility of a Polycaprolactone-Based Root Canal Filling Material to Degradation. I. Alkaline Hydrolysis.” *Journal of Endodontics* 31 (8): 593–98.
- Teixeira, Liliana S Moreira, Jan Feijen, Clemens A van Blitterswijk, Pieter J Dijkstra, and Marcel Karperien. 2012. “Enzyme-Catalyzed Crosslinkable Hydrogels: Emerging Strategies for Tissue Engineering.” *Biomaterials* 33 (5): 1281–90. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.10.067>.
- Temenoff, Johnna S., and Antonios G. Mikos. 2000. “Review: Tissue Engineering for Regeneration of Articular Cartilage.” *Biomaterials* 21 (5): 431–40. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(99\)00213-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(99)00213-6).
- Terraciano, Vanessa, Nathaniel Hwang, Lorenzo Moroni, Hyung Bin Park, Zijun Zhang, Joseph Mizrahi, Dror Seliktar, and Jennifer Elisseeff. 2007. “Differential Response of Adult and Embryonic Mesenchymal Progenitor Cells to Mechanical Compression in Hydrogels.” *Stem Cells* 25 (11): 2730–38. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0228>.
- Thomas, J O. 2001. “HMG1 and 2: Architectural DNA-Binding Proteins.” *Biochemical Society Transactions* 29 (Pt 4): 395–401.
- Tiku, M L, G T Allison, Karishma Naik, and S K Karry. 2003. “Malondialdehyde Oxidation of Cartilage Collagen by Chondrocytes.” *Osteoarthritis and Cartilage* 11 (3): 159–66.
- Topol, Lilia, Wen Chen, Hai Song, Timothy F Day, and Yingzi Yang. 2009. “Sox9 Inhibits Wnt Signaling by Promoting Beta-Catenin Phosphorylation in the Nucleus.” *The Journal of Biological Chemistry* 284 (5): 3323–33. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808048200>.
- Tropel, Philippe, Danièle Noël, Nadine Platet, Pierre Legrand, Alim-Louis Benabid, and François Berger. 2004. “Isolation and Characterisation of Mesenchymal Stem Cells from Adult Mouse Bone Marrow.” *Experimental Cell Research* 295 (2): 395–406. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2003.12.030>.
- Vater, Corina, Philip Kasten, and Maik Stiehler. 2011. “Culture Media for the Differentiation of Mesenchymal Stromal Cells.” *Acta Biomaterialia* 7 (2): 463–77. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.07.037>.
- Venezian, Rachel, Bruce J. Shenker, Sugandha Datar, and Phoebe S. Leboy. 1998. “Modulation of Chondrocyte Proliferation by Ascorbic Acid and BMP-2.” *Journal of Cellular Physiology* 174 (3): 331–41. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-)

4652(199803)174:3<331::AID-JCP7>3.0.CO;2-P.

- Vera, Lukasova, Buzgo Matej, Vocetkova Karolina, Kubíková Tereza, Tonar Zbyněk, Doupnik Miroslav, Blahnova Veronika, et al. 2018. "Osteoinductive 3D Scaffolds Prepared by Blend Centrifugal Spinning for Long-Term Delivery of Osteogenic Supplements." *RSC Advances* 8 (39): 21889–904. <https://doi.org/10.1039/C8RA02735H>.
- Vert, M., S. M. Li, G. Spenlehauer, and P. Guerin. 1992. "Bioresorbability and Biocompatibility of Aliphatic Polyesters." *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 3 (6): 432–46. <https://doi.org/10.1007/BF00701240>.
- Vinatier, C., D. Magne, A. Moreau, O. Gauthier, O. Malard, C. Vignes-Colombeix, G. Daculsi, P. Weiss, and J. Guicheux. 2007. "Engineering Cartilage with Human Nasal Chondrocytes and a Silanized Hydroxypropyl Methylcellulose Hydrogel." *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 80A (1): 66–74. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30867>.
- Vinatier, Claire, Dominique Mrugala, Christian Jorgensen, Jérôme Guicheux, and Danièle Noël. 2009. "Cartilage Engineering: A Crucial Combination of Cells, Biomaterials and Biofactors." *Trends in Biotechnology* 27 (5): 307–14. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.02.005>.
- Vocetkova, K., M. Buzgo, V. Sovkova, M. Rampichova, A. Staffa, E. Filova, V. Lukasova, M. Doupnik, F. Fiori, and E. Amler. 2017. "A Comparison of High Throughput Core-shell 2D Electrospinning and 3D Centrifugal Spinning Techniques to Produce Platelet Lyophilisate-Loaded Fibrous Scaffolds and Their Effects on Skin Cells." *RSC Advances* 7 (85): 53706–19. <https://doi.org/10.1039/C7RA08728D>.
- Vogel, Julia P., Krisztian Szalay, Florian Geiger, Martin Kramer, Wiltrud Richter, and Philip Kasten. 2006. "Platelet-Rich Plasma Improves Expansion of Human Mesenchymal Stem Cells and Retains Differentiation Capacity and in Vivo Bone Formation in Calcium Phosphate Ceramics." *Platelets* 17 (7): 462–69. <https://doi.org/10.1080/09537100600758867>.
- Vortkamp, A, K Lee, B Lanske, G V Segre, H M Kronenberg, and C J Tabin. 1996. "Regulation of Rate of Cartilage Differentiation by Indian Hedgehog and PTH-Related Protein." *Science (New York, N.Y.)* 273 (5275): 613–22.
- Wagner, Thomas, Jutta Wirth, Jobst Meyer, Bernhard Zabel, Marika Held, Jürgen Zimmer, Juan Pasantes, et al. 1994. "Autosomal Sex Reversal and Campomelic Dysplasia Are Caused by Mutations in and around the SRY-Related Gene SOX9." *Cell* 79 (6): 1111–20. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90041-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90041-8).
- Wang, J, J Zhou, and C A Bondy. 1999. "Igf1 Promotes Longitudinal Bone Growth by Insulin-like Actions Augmenting Chondrocyte Hypertrophy." *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 13 (14): 1985–90.
- Webber, Matthew J., John B. Matson, Vibha K. Tamboli, and Samuel I. Stupp. 2012. "Controlled Release of Dexamethasone from Peptide Nanofiber Gels to Modulate Inflammatory Response." *Biomaterials* 33 (28): 6823–32. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2012.06.003>.
- Yang, K.G. Auw, D.B.F. Saris, R.E. Geuze, Y.J.M. Van Der Helm, M.H.P. Van Rijen, A.J. Verbout, W.J.A. Dhert, and L.B. Creemers. 2006. "Impact of Expansion and Redifferentiation Conditions on Chondrogenic Capacity of Cultured Chondrocytes." *Tissue Engineering* 12 (9): 2435–47. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.2435>.

- Yang, Yueh-Hsun, and Gilda A. Barabino. 2011. "Requirement for Serum in Medium Supplemented with Insulin-Transferrin-Selenium for Hydrodynamic Cultivation of Engineered Cartilage." *Tissue Engineering Part A* 17 (15–16): 2025–35. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2010.0415>.
- Yarin, A.L. 2011. "Coaxial Electrospinning and Emulsion Electrospinning of Core-Shell Fibers." *Polymers for Advanced Technologies* 22 (3): 310–17. <https://doi.org/10.1002/pat.1781>.
- Yoo, Hyuk Sang, and Taek Gyoung Kim. 2009. "Surface-Functionalized Electrospun Nanofibers for Tissue Engineering and Drug Delivery." *Advanced Drug Delivery Reviews* 61 (12): 1033–42. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2009.07.007>.
- Yoshida, Carolina A, Hiromitsu Yamamoto, Takashi Fujita, Tatsuya Furuichi, Kosei Ito, Ken-ichi Inoue, Kei Yamana, et al. 2004. "Runx2 and Runx3 Are Essential for Chondrocyte Maturation, and Runx2 Regulates Limb Growth through Induction of Indian Hedgehog." *Genes & Development* 18 (8): 952–63. <https://doi.org/10.1101/gad.1174704>.
- Yu, Kai, Jingsong Xu, Zhonghao Liu, Drazen Sosic, Jiansu Shao, Eric N Olson, Dwight A Towler, and David M Ornitz. 2003. "Conditional Inactivation of FGF Receptor 2 Reveals an Essential Role for FGF Signaling in the Regulation of Osteoblast Function and Bone Growth." *Development (Cambridge, England)* 130 (13): 3063–74.
- Zaman, Farasat, Dionisios Chrysis, Kirsten Huntjens, Andrei Chagin, Masaharu Takigawa, Bengt Fadeel, and Lars Sävendahl. 2014. "Dexamethasone Differentially Regulates Bcl-2 Family Proteins in Human Proliferative Chondrocytes: Role of pro-Apoptotic Bid." *Toxicology Letters* 224 (2): 196–200. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.10.020>.
- Zander, Nicole E. 2015. "Formation of Melt and Solution Spun Polycaprolactone Fibers by Centrifugal Spinning." *Journal of Applied Polymer Science* 132 (2). <https://doi.org/10.1002/app.41269>.
- Zeng, Lei, Xiaofeng Chen, Qing Zhang, Feng Yu, Yuli Li, and Yongchang Yao. 2015. "Redifferentiation of Dedifferentiated Chondrocytes in a Novel Three-Dimensional Microcavitary Hydrogel." *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 103 (5): 1693–1702. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35309>.
- Zhang, Xiangwu, and Yao Lu. 2014. "Centrifugal Spinning: An Alternative Approach to Fabricate Nanofibers at High Speed and Low Cost." *Polymer Reviews* 54 (4): 677–701. <https://doi.org/10.1080/15583724.2014.935858>.
- Zhang, Yufu, Changyong Wang, Wen Liao, Zhanghua Li, Ximin Guo, Qiang Zhao, Cuimi Duan, and Renyun Xia. 2004. "In Vitro Chondrogenic Phenotype Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells." *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical Sciences = Hua Zhong Ke Ji Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ying De Wen Ban = Huazhong Keji Daxue Xuebao. Yixue Yingdewen Ban* 24 (3): 275–78.
- Zhao, Xinxin, Yuan Lui, Pei Toh, Say Loo, Xinxin Zhao, Yuan Siang Lui, Pei Wen Jessica Toh, and Say Chye Joachim Loo. 2014. "Sustained Release of Hydrophilic L-Ascorbic Acid 2-Phosphate Magnesium from Electrospun Polycaprolactone Scaffold—A Study across Blend, Coaxial, and Emulsion Electrospinning Techniques." *Materials* 7 (11): 7398–7408. <https://doi.org/10.3390/ma7117398>.
- Zheng, L, H S Fan, J Sun, X N Chen, G Wang, L Zhang, Y J Fan, and X D Zhang. 2010. "Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Induced by Collagen-Based Hydrogel: An in Vivo Study." *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* 93 (2):

- 783–92. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32588>.
- Zheng, Ming-Hao, Craig Willers, Lyn Kirilak, Piers Yates, Jiake Xu, David Wood, and Andrew Shimmin. 2007. “Matrix-Induced Autologous Chondrocyte Implantation (MACI<sup>®</sup>): Biological and Histological Assessment.” *Tissue Engineering* 13 (4): 737–46. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.0246>.
- Zheng Shu, Xiao, Yanchun Liu, Fabio S Palumbo, Yi Luo, and Glenn D Prestwich. n.d. “In Situ Crosslinkable Hyaluronan Hydrogels for Tissue Engineering.” *Biomaterials* 25 (7–8): 1339–48.
- Zhou, Guang, Qiping Zheng, Feyza Engin, Elda Munivez, Yuqing Chen, Eiman Sebald, Deborah Krakow, and Brendan Lee. 2006. “Dominance of SOX9 Function over RUNX2 during Skeletogenesis.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (50): 19004–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605170103>.
- Zolnik, Banu S., and Diane J. Burgess. 2008. “Evaluation of in Vivo–in Vitro Release of Dexamethasone from PLGA Microspheres.” *Journal of Controlled Release* 127 (2): 137–45. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2008.01.004>.